



**AFLATOXINAS EN ALIMENTOS:
SU DETECCION Y CUANTIFICACION POR
METODOS FISICOQUIMICOS**

**POR
L.C.Q. KARIM ACUÑA ASKAR**

**TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA
DE LA
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
COMO REQUISITO PARCIAL PARA
LA OBTENCION DEL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN
QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA**

MONTERREY, N.L., MEXICO AGOSTO DE 1991

TM

Z6658

FM

1991

A2



1020071193



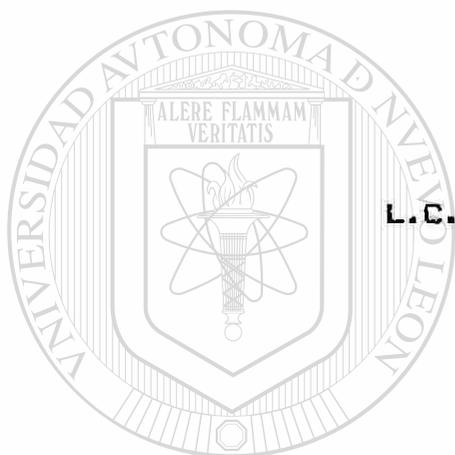
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**AFLATOXINAS EN ALIMENTOS :
SU DETECCION Y CUANTIFICACION POR
METODOS FISICOQUIMICOS.**



POR

L.C.Q. KARIM ACUÑA ASKAR

**TESIS PRESENTADA A LA
FACULTAD DE MEDICINA**

DE LA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

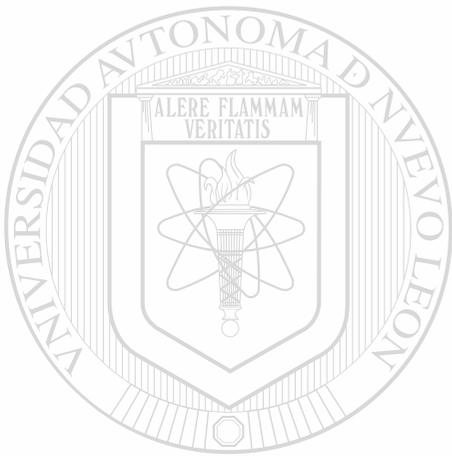
**COMO REQUISITO PARCIAL PARA
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
LA OBTENCION DEL GRADO DE**

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN QUIMICA ANALITICA BIOMEDICA

MONTERREY, N.L., MEXICO AGOSTO DE 1991

TM
26658
FM
1991
A2



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



FONDO TESIS
163669

EL COMITE DE TESIS:



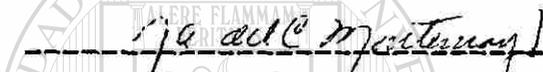
DRA. NOEMI WAKSMAN DE TORRES

PRESIDENTE



DR. MANUEL RODRIGUEZ QUINTANILLA

PRIMER VOCAL



G.C.B. Ma. CARMEN MONTEMAYOR GAYTAN

SEGUNDO VOCAL



M.C. LAURA E. MARTÍNEZ VILLARREAL

TERCER VOCAL



M.C. LIDIA R. NACCHA TORRES

SECRETARIO

APROBO:



DR. MARIO CESAR SALINAS CARMONA

SRIO. ACADEMICO DE AREA BASICA, SUBDIRECCION DE INVESTIGACION
Y ESTUDIOS DE POST-GRADO, FACULTAD DE MEDICINA,
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON.

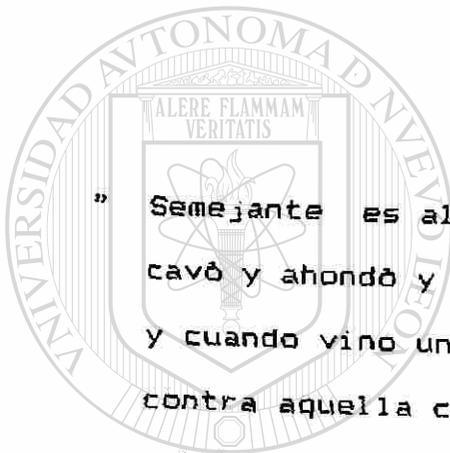


El presente trabajo se llevó a cabo
en el Laboratorio de Micotoxinas
del Departamento de Química Analítica
de la Facultad de Medicina de la
Universidad Autónoma de Nuevo León,
bajo la dirección de:



DR. MANAHEN FERNANDEZ ALONSO
JEFE DPTO. QUÍMICA ANALÍTICA.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



" Semejante es al hombre que al edificar una casa, cavó y ahondó y puso el fundamento sobre la roca; y cuando vino una inundación el río dio con impetu contra aquella casa, pero no la pudo mover, porque estaba fundada sobre la roca "

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Jesús
(Lucas, 6: 48)

A mis padres:

Lic. Carlos Acuña Nuding y Sra. Herlinda Askar de Acuña, quienes han sido para mí fuente inagotable de estímulo y que gracias a su infinito apoyo, la consecución de un arduo esfuerzo una vez más fructificò.

Con amor y gratitud.



UANL

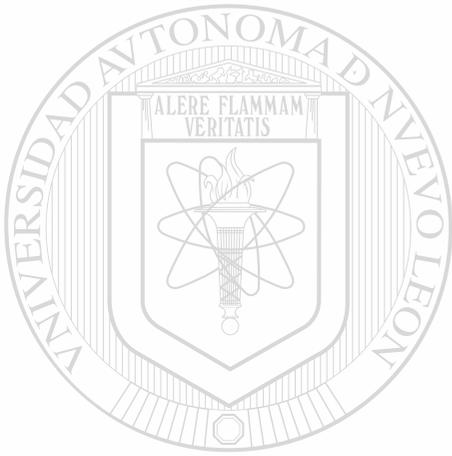
A mis hermanos: UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



Lissilette, Carlos, Hapssi, Antonio y Jorge, por su ilimitada disposición en brindarme su apoyo.

A mis tíos:

Sr. Alfredo Nacoud Askar y Sra. Loriz Askar de Nacoud,
quienes siempre han estado atentos de mi formación en
Monterrey.



UANL

Al Dr. Alfredo Nacoud Askar, alguien valioso con quien contar. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mi asesor:

Dr. Manahén Fernández Alonso, quien a través de su visionaria y dinámica estrategia de Dirección, la meta de esta investigación llegó a ser una realidad.

Por la trascendencia de sus enseñanzas.

Con aprecio y gratitud.

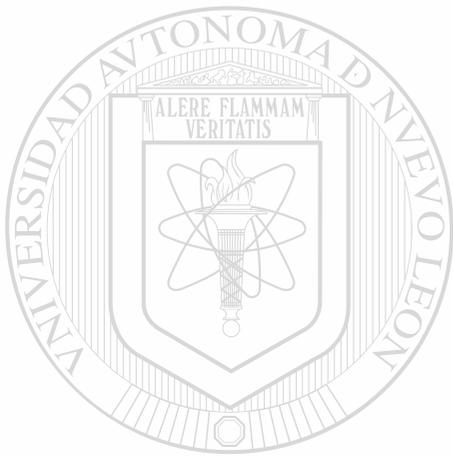
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



A mis sinodales:

Por su ilimitada disposición de proveerme los medios necesarios en la búsqueda por la superación académica.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

A mis maestros:

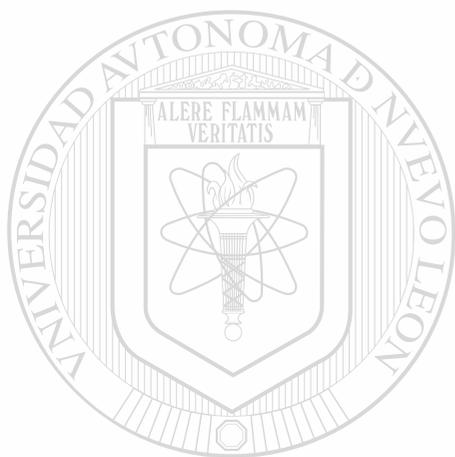
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por la nobleza que envuelve su labor socrática.



A mis alumnos.

Por ser partícipes del ilustre proceso de enseñanza.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A mis compañeros y amigos.

Por su apoyo al enfrentar los retos.

AGRADECIMIENTOS

La presente investigación difícilmente podría haberse realizado sin la ayuda sostenida de mucha gente.

Agradezco al cuerpo de sinodales la revisión del manuscrito y las valiosas sugerencias que me hicieron a fin de llevar a cabo lo más perfectamente posible el presente trabajo.

Por sus sabios consejos debo expresar mi agradecimiento al M.C. Humberto Garza Ulloa, director general de INDEQUIM, cuya instrucción me ayudó a comprender mejor muchos de los fenómenos cromatográficos involucrados, lo cual me fue útil en la toma de decisiones.

Dentro de la enorme gama de posibilidades para abordar un problema, es de esperarse la existencia de la mejor opción para hacerlo. Sea patente mi gratitud al Dr. Thomas B. Whitaker del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, en la Universidad Estatal de Carolina del Norte por haberme orientado a elegir las óptimas condiciones para la extracción de aflatoxinas a partir de cacahuates; igualmente por ilustrarme con minucioso detalle sobre la dependencia de la variabilidad en función del tamaño seleccionado de muestra.

Agradezco al Dr. Leonard S. Stoloff su valiosa ayuda brindada a través del Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos.

Estoy agradecido con el Dr. Julio Martínez Burnes de la Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Autónoma de Tamaulipas por el apoyo que recibí cuando acepté su invitación para exponer en su entidad las metodologías de análisis que en ese tiempo estaba desarrollando. Igualmente con el Dr. René Rosiles Martínez de la Facultad de Medicina Veterinaria de la UNAM por su interés en cooperar abiertamente con nuestros laboratorios. Asimismo, con el personal de la UNAM por las atenciones que me proporcionó durante mi estancia allí.

Expreso mi agradecimiento a la Biól. Carmen Borrego López de la Universidad Autónoma de Coahuila por haberme proporcionado valiosa literatura sobre micotoxinas que yo desconocía. Igualmente por su franco interés en colaborar con nuestra investigación.

Deseo dar las gracias al personal del Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) en El Batán Texcoco, Edo. de México que amablemente me atendió durante mi visita.

Muchas dificultades fueron superadas gracias a la generosidad de la M.C. Graciela García de la Facultad de Biología de la UANL, quien me concedió la oportunidad de trabajar en sus laboratorios y de esta manera sacar adelante lo que parecía imposible.

Los altos costos de operación que demanda la técnica de HPLC fueron aventajados gracias al decisivo apoyo que dió al área de investigación la maestra Q.C.B. Esperanza Torres de Navarro, Jefe del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la UANL, a quien expreso mi gratitud por haberme proporcionado los medios económicos necesarios. Igualmente por su comprensión y paciencia ante mi incesante insistencia. De la misma manera agradezco al Q.C.B. Lorenzo Heyer Rodríguez del Departamento de Química Analítica, quien atendió la totalidad del Servicio Externo de Análisis y que con su esmerado empeño produjo más de los recursos suficientes.

Infinito agradecimiento a la Dra. Graciela López de Garza, Subdirector de Pre-Grado de la Facultad de Medicina de la UANL por permitirme disponer de los servicios de información y comunicación de telefax.

Mi gratitud a la Lic. Georgina Arteaga, director de la biblioteca de nuestra Facultad por su abierta disposición de proveerme la más actualizada bibliografía. De la misma manera al dinámico grupo del Centro Regional de Información y Documentación en Salud (CRIDS) que me facilitó toda información de manera oportuna.

Debo agradecer la colaboración de las Q.C.B. Rosa Nelly Arroyo Díaz y Thelma Avila Rodríguez quienes participaron en el comienzo de esta investigación y que mostraron una inagotable paciencia ante la minuciosa práctica que impone la búsqueda de la precisión y exactitud.

Deseo expresar mi agradecimiento a la Q.C.B. María de la Luz Salazar Cavazos por la generosa ayuda que me brindó para sortear un sinnúmero de dificultades que se presentaron durante la realización de este trabajo.

Igualmente con profunda gratitud deseo reconocer el desinteresado apoyo que recibí del Lic. Rodolfo Cortés Martínez quien siempre estuvo al pendiente de mis aprietos frente a las computadoras. De la misma manera al M.C. Enrique A. Alcorra Garza, quien me proporcionó ayuda oportuna siempre que se la solicité.

Deseo dar las gracias a la Q.C.B. Judith Rocha Gámez, quien durante mi ausencia emprendió la organización y presentación de algunos de los trabajos de investigación en el VIII Encuentro de Investigación Biomédica.

Asimismo a los estudiantes Alejandro Balderas Mireles, Juan P. Castellón Santa Anna y Ricardo Montoya Olivera por su entusiasmo en la presentación de los trabajos en el mismo Encuentro. Vaya también merecido reconocimiento a ellos por haber triunfado en un concurso nacional estudiantil celebrado en Guadalajara, al presentar parte de esta investigación.

Un trabajo de la naturaleza de éste, requiere sin duda del apoyo continuo de los más especializados proveedores de material y equipo; expreso mi agradecimiento al Ing. Ramón Pérez Schmidt de IASA, representante de VARIAN por las atenciones que recibí de su parte.

De la misma manera agradezco al Ing. Rodolfo Valadez de RODVAL, representante de MILLIPORE por la asistencia constante y eficaz que me proporcionó para seleccionar los materiales más adecuados según las necesidades que se iban presentando.

También estoy agradecido con Agustina de los Santos Vega Alonso, Maribel Esparza Duque, Graciela Peña Abundis y Agustín Nambo Aspera, personal del almacén quienes me asistieron en la búsqueda de materiales y reactivos y que a pesar de que para ellos era parte de su rutina normal, para mí representaba cual insólita perquisición en medio de una incomprensible organización.

Igualmente deseo dar las gracias a la Srta. Angeles Martínez Martínez y a Gloria M. Martínez Peña, secretarías del Departamento de Química Analítica por su colaboración en la preparación de las figuras del manuscrito. Asimismo a los Sres. Eliezer Alanís y Benigno Leal del Departamento de Fotografía por la disposición que me mostraron al tenerme en forma oportuna todo el material de diapositivas que generó esta investigación.

Mi agradecimiento a la Sra. Socorro Valles de la Subdirección de Investigación y Estudios de Post-Grado por llevar en orden y a tiempo todos mis registros académicos.

Expreso mi gratitud a mis compañeras de oficina, Q.C.B. Azeneth A. Guzmán Rodríguez y M.C. Lidia Naccha, quienes a pesar de su delicadeza por mantener el orden, las acostumbré a ver montones de papeles, libros y revistas por doquier. Al resto del personal del Dpto. de Química Analítica agradezco la tolerancia que me tuvieron cuando en muchas ocasiones mostré el adusto carácter en el que derivaron los desvelos, igualmente por haberme permitido mantener los laboratorios en lo que para ellos era un estado entrópico, pero para quien trabajó y supo lo que hacía no lo fue.

Finalmente, deseo dar las gracias al M.C. Carlos R. Escalante, M.C. Aurelio Alvarez y M.C. Adrián Vilalta de la Universidad Georgetown y al Dr. Manuel Villagarcía de la Universidad Johns Hopkins por todas las atenciones que me brindaron y muy especialmente durante la preparación del cartel con el cual se presentó esta investigación en la Conferencia de Pittsburgh celebrada en Chicago en este mismo año. Asimismo agradezco al Lic. Alfonso Reyes Garza su incondicional apoyo a lo largo de un intenso esfuerzo que fructificó en esta modesta aportación del autor.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Monterrey, N.L. 1991.

INDICE TEMATICO

	Pàg.
CAPITULO 1	
Antecedentes.	1
Detección de las aflatoxinas.	2
Diversidad estructural.	3
Condiciones que favorecen el crecimiento de <u>Aspergillus flavus.</u>	8
Sensibilidad en varios animales.	11
Propiedades carcinogénicas de las aflatoxinas.	17
Control de las aflatoxinas en varios países.	22
Hipótesis.	23
Objetivo general.	23
CAPITULO 2	
Materiales y métodos.	24
Preparación de soluciones patrón.	24
Análisis cromatográfico.	27
Mediciones por HPLC.	28
Mediciones directas.	29
Extracción de aflatoxinas en maíz.	31
Metodología para evaluar las intc eferncias del maíz.	35
Extracción de aflatoxinas en cacahuete.	37
Extracción de aflatoxinas en nuez.	38

Metodología de los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación en maíz.	41
Metodología de los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación en cacahuate.	54
Metodología de los cálculos para obtener los porcentajes de recuperación en nuez.	61
Metodología de los cálculos para obtener los límites de detección.	66
Métodos de HPLC-Fluorescencia molecular.	66
Métodos de HPLC-Absorción ultravioleta.	72
Métodos directos de fluorescencia molecular.	78
Métodos directos de absorción ultravioleta.	83
CAPITULO 3	
Resultados y discusión.	88
Discusión de los procedimientos de extracción de aflatoxinas a partir de maíz.	88
Discusión de los procedimientos de extracción de aflatoxinas a partir de cacahuate.	114
Discusión de los procedimientos de extracción de aflatoxinas a partir de nuez.	123
Discusión de los métodos fisicoquímicos de detección.	126
Métodos por HPLC.	126
Métodos directos.	134
Conclusiones.	155
CAPITULO 4	
Bibliografía.	156
Lecturas sugeridas.	165

CAPITULO 5

Apèndice A

Glosario. 174

Apèndice B

Metodologia de análisis usando estándar interno. 176

Apèndice C

Evaluación de parámetros cromatográficos del empaque Micropak. 179

Apèndice D

Condiciones de seguridad para el manejo de aflatoxinas. 180

Apèndice E

Curvas de calibración por fluorescencia directa y ultravioleta y espectros de fluorescencia de las aflatoxinas. 183

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

Figuras

Págs.

1

6

2

7

3-5

89-91

6

94

7

95

8

97

9

98

10-22

100-112

23-29

115-121

30

124

31

125

32-37

127-132

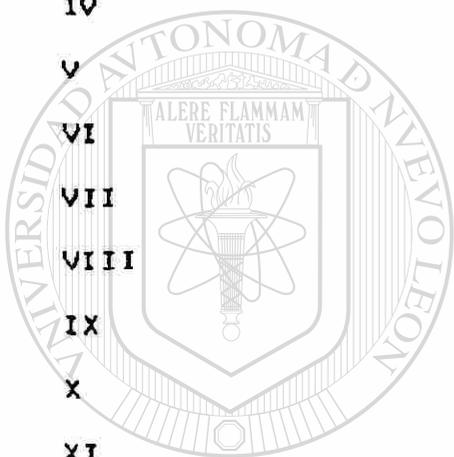
38-46

138-146[®]

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE TABLAS

Tablas	Pág.
I	93
II	113
III	122
IV	133
V	135
VI	136
VII	147
VIII	149
IX	150
X	151
XI	152
XII	153
XIII	154



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C A P I T U L O 1

ANTECEDENTES

Las aflatoxinas son un grupo de metabolitos que debido a su estructura molecular se les clasifica dentro de las difuranocoumarinas (figs.1 y 2). Los estudios toxicológicos han demostrado su actividad carcinogénica, hepatotóxica, teratogénica e inmunosupresora (1).

Una gran variedad de hongos producen las aflatoxinas, destacando como los de mayor producción Aspergillus flavus LINK y Aspergillus parasiticus SPEARE. Estos hongos se encuentran con frecuencia en gránulos alimenticios cuyas condiciones favorecen su desarrollo y, por ende, la producción de aflatoxinas.

Las investigaciones realizadas sobre aflatoxinas han sido producto de la inquietud que se presentó por una serie de brotes de enfermedades en aves de corral y peces en diversos lugares del mundo durante 1960. El caso de mayor relevancia fue el de pérdidas de pavos en Inglaterra como resultado de un agente etiológico entonces desconocido: así, el padecimiento se denominó como "la enfermedad X del pavo". Esta se caracterizó por necrosis hepática aguda con hiperplasia en los conductos biliares. La sintomatología en su estado agudo se manifestó con pérdida del apetito, letargo y debilidad. En su estado avanzado la muerte era inevitable. Mediante una búsqueda de la fuente de intoxicación se encontró como común denominador de la enfermedad, el consumo de cacahuate molido, un subproducto de la extracción del aceite de cacahuate procedente de Brasil y algunos países africanos.

En el mes de septiembre de 1960, dos investigadores: Ayerst y Austwick, analizando el alimento consumido por los animales hallaron la presencia de micelio fungal. Este hallazgo motivó su aislamiento siendo identificado como Aspergillus flavus. En 1962, un grupo de investigadores del Departamento de Investigación Científica e Industrial del Instituto de Productos Tropicales en Londres, Inglaterra encabezados por Nesbitt y O'Kelly (2), reportaron el aislamiento de las aflatoxinas B 1 y G 1 y, un año más tarde, ellos mismos reportaron el aislamiento de B 2 y G 2 (3), (figs. 1 y 2). Las letras se refieren a los colores que emiten cuando son irradiadas con longitud de onda cercana a 360 nm. (las B emiten un color azul y las G un color verde); los subíndices se refieren a su posición relativa en las placas cromatográficas.

Aspergillus flavus se asoció con brotes previos de síntomas tóxicos posteriores a 1961. En 1952, Seibold y Bailey describieron una enfermedad en perros que denominaron "hepatitis X". Posteriormente se determinó que la causa era la ingestión de cacahuete en la dieta de estos animales. Igualmente, el envenenamiento del ganado vacuno y porcino con maíz mohoso se asoció con la presencia de Aspergillus flavus y otros hongos, entre ellos Penicillium rubrum. Más tarde se demostró que el envenenamiento del ganado porcino produjo la misma "hepatitis X" que se había presentado anteriormente en los canes.

La amplia contaminación de una variedad de alimentos refleja la distribución tan extensa de A. flavus en la naturaleza. El maíz y el cacahuete representan los alimentos que proveen las más altas posibilidades de contaminación, mientras que el frijol de soya presenta cierta resistencia a la producción de aflatoxinas pero no a la contaminación fungal.

Inicialmente, la producción de aflatoxinas en el campo se consideró un problema debido al almacenamiento inadecuado de los granos; sin embargo, mediante investigaciones posteriores se comprobó la presencia de A. flavus y aflatoxinas en maíz antes de cosecharse (4). Resultados similares se obtuvieron para el algodón y el cacahuete, lo cual significa que el problema incluye tanto el cultivo como el almacenamiento (5).

Cabe destacar que los insectos desempeñan el papel de vectores en la contaminación de los plántos, así también, otros factores tales como temperatura, humedad, trazas de cinc son esenciales para estimular el desarrollo de los hongos.

DETECCION DE LAS AFLATOXINAS.

Para la detección de las aflatoxinas existen numerosos métodos tanto para el análisis cualitativo como cuantitativo. Generalmente se emplea la extracción con solventes orgánicos, la separación de compuestos de interferencia y finalmente, la característica fluorescencia o absorción en la zona del espectro ultravioleta.

Sin embargo, la mayoría de los métodos reportados en la literatura presentan una serie de inconvenientes entre los que se encuentran el uso de solventes demasiado costosos, así como sistemas sofisti-

cados de detección como la espectrometría de masas acoplada a la cromatografía de gases (6). Se han reportado métodos sencillos y muy accesibles, como la minicolumna (7), sin embargo, su demasiada simplicidad los hace ser poco cuantitativos.

La Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución constituye una poderosa técnica para separar aflatoxinas y, aunque se han reportado métodos indicando su uso (8, 9, 10, 11), cabe señalar que los solventes usados como fase móvil son costosos para laboratorios modestos, además de que los métodos de aislamiento de las toxinas son complejos y laboriosos. Asimismo, el uso de muestras de 50 gramos resta poder de recuperación.

Recientemente se han desarrollado métodos de ELISA (12), para el análisis de aflatoxina B 1, pero presenta el inconveniente del uso de reactivos demasiado específicos y de alto precio, lo cual disminuye la disponibilidad que pudiera tenerse para llevar a cabo esta técnica.

Pueden también encontrarse en el mercado equipos de prueba para el aislamiento rápido de aflatoxinas, conocido comercialmente como "Aflatest"; sin embargo, con este método no se puede obtener la cantidad exacta de cada toxina, puesto que la medición que se realiza es para el conjunto de todas ellas es decir, el total de las aflatoxinas presentes.

Así pues, por lo anteriormente expuesto, se puede ver que aunque existen métodos propuestos, aún persisten inconvenientes; es por ello que, con la finalidad de seleccionar los métodos más adecuados para el análisis, nos avocamos a la tarea de evaluar métodos físico-químicos de detección tales como fluorescencia y ultravioleta. Igualmente para cada una de estas dos variantes se comparó la detección directa después de la extracción de la muestra y el uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución como un medio de separación antes de la detección de los analitos. Estos métodos fueron aplicados al análisis de maíz, cacahuate y nuez.

DIVERSIDAD ESTRUCTURAL DE AFLATOXINAS.

En varios laboratorios del mundo se llevaron a cabo esfuerzos para conocer las estructuras moleculares de las aflatoxinas. Para ello era necesario lograr primero la identificación de las muestras tóxicas y a partir de ellas lograr su aislamiento.

Originalmente, los factores tóxicos se aislaron a partir de alimento para consumo animal, y fueron separados cromatográficamente, siendo cuatro los compuestos distintos: aflatoxinas B 1, B 2, G 1, G 2. La elucidación estructural de las B 2 y G 2 indicó que se trataba de derivados dihidrogenados de las originales B 1 y G 1 (13, 14, 15, 16). Las aflatoxinas contienen un núcleo de coumarina fusionado a un difurano y, dependiendo de si son del conjunto de las B, contienen una pentanona, si son del conjunto de las G, contienen una lactona de seis miembros. De acuerdo con las pruebas efectuadas las aflatoxinas B 1 y G 1 resultaron ser más tóxicas que las B 2 y G 2, en patos (3), ratas (17) y peces (18).

La aflatoxina B 1 destaca por ser la más tóxica de las cuatro; igualmente la potencia carcinogénica lleva el siguiente orden: B 1 > G 1 > B 2 > G 2.

Los derivados hidroxilados de las aflatoxinas, denominados aflatoxinas M 1 y M 2 pueden encontrarse en la leche de vacas alimentadas con raciones contaminadas de aflatoxina B 1.

La aflatoxina G M 1, un derivado hidroxilado de la aflatoxina G 1 puede encontrarse también en cultivos de *Aspergillus flavus*. Sin embargo, la aflatoxina G M 1 es un metabolito que se encuentra en muy reducida cantidad. Otros derivados producidos por *A. flavus*, son las 2--hidroxiaflatoxinas, las que se conocen con los nombres de B 2a y G 2a (19).

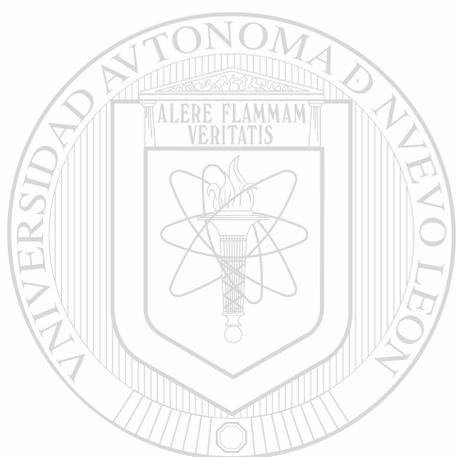
El Parasiticol o aflatoxina B 3, se considera un posible precursor de la biosíntesis de las aflatoxinas; su aislamiento fue posible a partir del arroz y del trigo inoculado en el laboratorio (20). Los patos jóvenes son tan sensibles a la B 3 como a la B 1; mientras que los embriones de pollo son menos sensibles a la B 3 que a la B 1 (21).

La reducción de la pentanona de la aflatoxina B 1 llevada a cabo por microorganismos produce aflatoxicol (22).

Los animales también metabolizan B 1 por la O-dimetilación para producir aflatoxina P 1; la cual ha sido detectada en la orina de varias especies de animales (23). Sin embargo P 1 ha demostrado ser menos tóxica que B 1 (24).

La aflatoxina Q 1 es el principal metabolito producido por B 1 en los microsomas del hígado in vitro tanto de monos como de humanos; contiene un grupo hidroxilo en la posición del carbono-3.

Los procedimientos de detoxificación usando amoníaco producen dos principales metabolitos de B 1; estos son: aflatoxina D-1 y aflatoxina D-2 (2S). El tratamiento con amoníaco abre el anillo de lactona de seis miembros de la aflatoxina B 1.



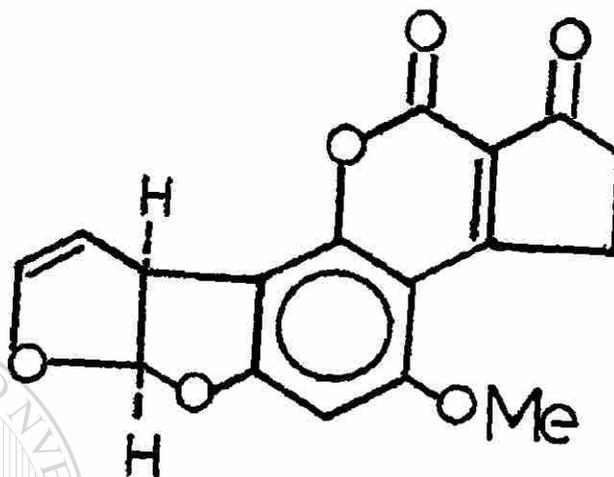
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

B₁



B₂

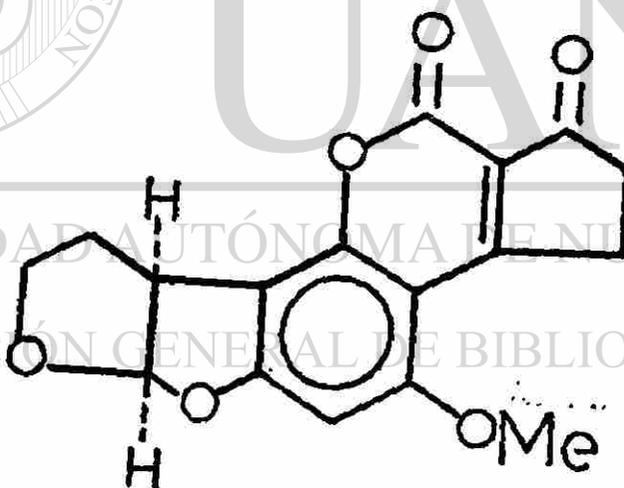
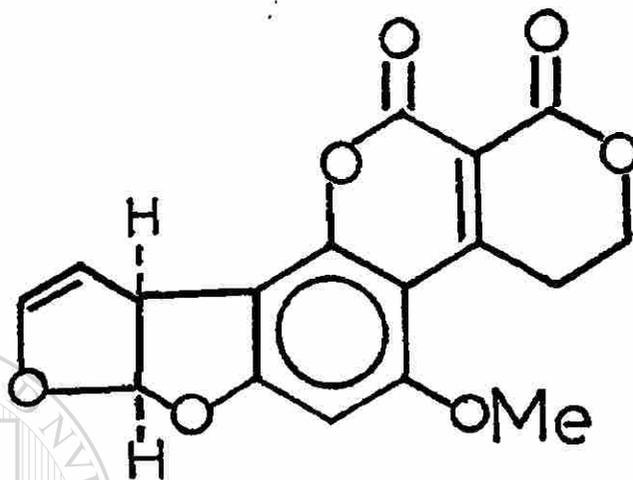


FIG.1

G₁



G₂

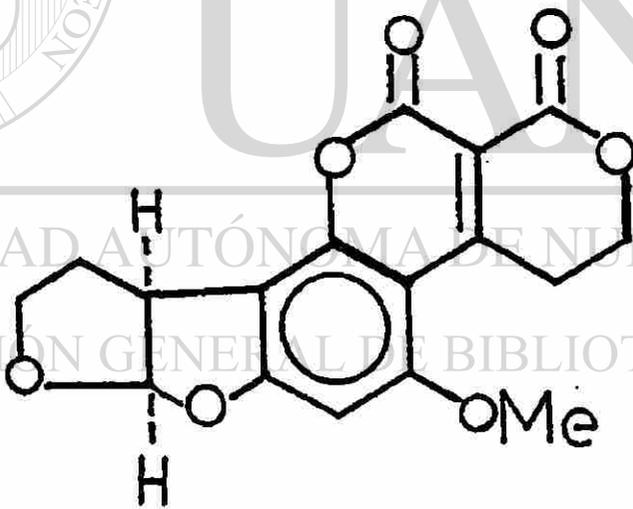


FIG.2

PRESENCIA DE ASPERGILLUS FLAVUS.

Se ha encontrado la presencia de Aspergillus flavus, el mayor productor de aflatoxinas en :

MAIZ	PULPA DE BETABEL
CACAHUATE	ALGARROBA
NUEZ	HABICHUELA
FRIJOL DE SOYA	PISTACHO
CACAO	MIJO
CAFE	PIMIENTA ROJA
TABACO	CHICHARO
SORGO	GIRASOL

Las condiciones que propician el crecimiento de Aspergillus flavus son las siguientes:

CONDICIONES	EXTREMAS (26)	OPTIMAS (27)
Temperatura	6-54 oC	15-30 oC
Humedad	9-35 %	15-25 %

Otras condiciones que favorecen el crecimiento de Aspergillus flavus son las siguientes (27):

SACAROSA : 30-200 G/L
NITRATO COMO FUENTE DE NITROGENO.

Los metales presentes en el grano huésped que estimulan la producción de aflatoxinas son los siguientes:

CINC (28)	CADMIO (28)
MAGNESIO (29)	HIERRO (29)

El metal que inhibe la producción de aflatoxinas: bario, preferentemente como acetato (28).

ALGUNOS HONGOS QUE PRODUCEN AFLATOXINAS SON LOS SIGUIENTES:

<u>Aspergillus flavus</u>	LINK
<u>Aspergillus parasiticus</u>	SPEARE
<u>Aspergillus tamarii</u>	KITA
<u>Aspergillus niger</u>	TLEGEH
<u>Aspergillus ostianus</u>	WEHMER
<u>Aspergillus ruber</u>	T.y C.

HONGOS QUE PRODUCEN TRAZAS DE AFLATOXINAS SON LOS SIGUIENTES:

<u>Penicillium citrinum</u>	THOM
<u>Penicillium variable</u>	SOFP
<u>Penicillium frequentans</u>	WESTL

CARACTERISTICAS DE LA TOXICIDAD DE LAS AFLATOXINAS.

Dosis letal para patos jóvenes.

Una vez identificadas las aflatoxinas y habiéndose conocido sus propiedades tóxicas, varios laboratorios del mundo se avocaron a la tarea de conocer las dosis letales para diferentes géneros y especies. Las primeras investigaciones se enfocaron hacia patos de un día de nacidos dada su alta susceptibilidad toxicológica.

Los resultados se basaron en el suministro de 0.1 ml. de diferentes concentraciones de aflatoxinas en propilénglicol a Patos -- Blancos de Pekín de un día de nacidos (peso corporal 51 g). La mortalidad se registró a las 48 horas después de la administración a través de la molleja. Bajo estas condiciones se determinaron las dosis letales 50% (13) :

AFLATOXINAS	D L
	50
B 1	0.564 mg/Kg
G 1	1.8 mg/Kg

La mayor parte de las determinaciones de DL se usaron patos jóvenes se registraron seis días después de la administración de las aflatoxinas en propilénglicol o en dimetilformamida.

Posteriores trabajos reportaron los valores de DL ₅₀ para las otras aflatoxinas (30):

AFLATOXINAS	D L
	50
B 2	1.096 mg/Kg
G 2	3.450 mg/Kg

Siendo que la única diferencia que existe entre las aflatoxinas de subíndice 1 respecto de las de subíndice 2 consiste en que las dos primeras presentan un doble enlace en el sistema de anillos de difurano, puede observarse que es la ausencia de éste lo que les confiere menor toxicidad a las aflatoxinas. También puede observarse una menor toxicidad debido a la expansión del anillo de ciclopentenona a un segundo anillo de lactona.

DOSIS LETAL PARA UNA VARIEDAD DE MAMIFEROS DE LABORATORIO.

Al mismo tiempo en otros laboratorios se experimentaban las dosis letales para mamíferos de laboratorio como se menciona a continuación.

Para la rata macho tipo Fischer recién destetada la DL ₅₀ oral de aflatoxina B 1 fue 5.55 mg/Kg; es decir, diez veces más el valor para los patos de un día de nacidos. Cabe señalar que la rata hembra es menos sensible que el macho, ya que se encontró su valor de DL ₅₀ en 7.44 mg/Kg (17).

La rata tipo Wistar mostró aún mayor diferencia en la sensibilidad entre el macho y la hembra; siendo para el primero la DL ₅₀ de 7.2 mg/Kg y para la hembra 17.9mg/Kg (31).

El ratón es particularmente resistente a las aflatoxinas (32), mientras que el conejo tiene una sensibilidad comparable a la de los patos jóvenes (33); la DL ₅₀ oral para el conejo joven se ubica entre 0.2-0.4 mg/Kg (34). En los cobayos la dosis máxima que no provoca cambios histopatológicos observables es del orden de 6.25 microgramos de aflatoxina B 1, 100 microgramos de B 2, 25 microgramos de G 1 y 800 microgramos de G 2 (35). La dosis teratogénica para los fetos de ocho días del Hamster es 4 mg/Kg suministrada por inyección (36).

SENSIBILIDAD EN VARIOS ANIMALES.

Aunque los animales de granja son por lo general sensibles a las aflatoxinas, los ruminantes están entre los más resistentes. Los animales jóvenes son siempre más sensibles que los adultos.

Mamíferos de granja.

Orden decreciente de la susceptibilidad a las aflatoxinas:

**CERDOS
VACAS
CABALLOS
OVEJAS.**

Mientras el cerdo joven de tres a doce semanas es muy sensible a las aflatoxinas, esta sensibilidad desciende en el adulto y es necesario tener considerables cantidades de toxinas en el alimento (una ración conteniendo 17.5-20 % de forraje tóxico por un período de 22-182 días) con la finalidad de observar una reducción notable en el desarrollo y la aparición de cambios en el hígado (37,38).

Algunas experiencias que se registraron al alimentar ganado con harina de cacahuete procedente de Brasil se mencionan a continuación.

En vacas de dos años de edad, concentraciones correspondientes a 0.22, 0.44 o 0.66 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo de la alimentación diaria tuvo pequeños efectos después de 20 semanas, aunque se presentaron ligeras lesiones hepáticas (39). Cuando el alimento suministrado contenía 2.4 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo y se alimentó durante trece meses a vacas de diez años de edad, los efectos resultaron notorios después del séptimo mes (40).

No se han detectado mutaciones en gestantes de vaca (40), y de rata, aunque en estas últimas se han encontrado residuos de aflatoxinas en placenta (41).

La alta resistencia de las ovejas a las aflatoxinas se explica por su capacidad eficiente de excreción (42).

Aves de corral.

Las aves de corral se clasifican en el siguiente orden decreciente de susceptibilidad:

**PATOS JOVENES
PAVOS
GANSOS Y FAISAN
POLLOS.**

Algunos otros experimentos se realizaron en aves de corral como el pollo, el cual, demostró ser relativamente resistente, y aunque la mortalidad es baja en ellos, si ocurren cambios hepáticos (43,44). Se ha reportado también que los pavos y los faisanes son un poco más sensibles que los pollos.

La literatura también reporta que cuando se alimentó a patos jóvenes con una dieta conteniendo 2.5 % de alimento tóxico correspondiente a 0.3 mg de B 1 por kilogramo, diariamente por seis semanas, presentaron una mortalidad del 30 % y los que sobrevivieron mostraron una considerable pérdida de peso.

Cuando a los patos de un día de nacidos se les administraron 100 microgramos diariamente durante 5 días, se produjeron lesiones hepáticas; dosis de 2000 microgramos por más de cinco días causaron proliferaciones de tejido en los conductos biliares en todos los casos.

Una dieta conteniendo solamente 6.25 % de cacahuate contaminado puede matar a patos jóvenes dentro de los trece días si la alimentación comienza dentro de los primeros seis días de su vida (45).

Un amplio intervalo de lesiones hepáticas (hiperplasia del epitelio del conducto biliar, colangitis, hepatoma, colangioma) se han observado en truchas alimentadas con harina de cacahuate contaminado, semillas de algodón y soya (46).

SINTOMAS DE TOXICIDAD REGISTRADOS EN DIFERENTES GENEROS Y ESPECIES.

Toxicidad aguda y crónica.

Las aflatoxinas producen un número de síntomas asociados con la toxicidad aguda y cambios asociados con toxicidad crónica. Esto último incluye tres tipos de actividad anteriormente mencionados: carcinogénica, teratogénica y mutagénica (47).

La toxicidad aguda se expresa como la muerte del animal en un tiempo que depende de la sensibilidad particular (48). En general, el hígado se muestra pálido, decolorido, y se incrementa en tamaño. Las necrosis del parénquima hepático y las hemorragias se registran frecuentemente en cerdos y patos jóvenes y en pavos. Si la muerte no ha ocurrido dentro de una semana, puede hallarse una proliferación característica de células no diferenciadas en los espacios de la vena porta (48). El riñón puede mostrar lesiones entre las cuales se encuentra la nefritis glomerular.

Los cambios asociados con envenenamiento crónico son muy distintos. Los primeros síntomas visibles aparecen como una pérdida del apetito y reducción en el crecimiento, pero es el hígado, el que es más rápidamente afectado por la actividad de la toxina (49); se congestiona y muestra zonas hemorrágicas y necróticas. La proliferación de células epiteliales de los conductos biliares es característico en ganado, patos jóvenes y pavos. En pollos, la destrucción de las células del parénquima hepático y la proliferación de células epiteliales ocurren durante las dos primeras semanas (43).

La mayor parte de las indicaciones características de toxicidad con frecuencia aparecen solamente unos pocos días antes de morir.

EXAMENES CLINICOS E HISTOPATOLOGICOS.

Toxicidad en cerdos.

Los síntomas característicos de aflatoxicosis en los cerdos son ataxia y severo tenesmo. Anorexia y pérdida de peso acompañan a estos síntomas cuando la dosis de aflatoxina es mayor de 0.1 mg/Kg (50).

Toxicidad en vacas.

En la vaca, las lesiones hepáticas consisten principalmente de cirrosis. En intoxicación experimental de la vaca se notó hiperplasia de las células hepáticas desde el final del primer mes; este fenómeno se incrementa durante el segundo y el tercer mes, hasta que llega a aparecer degeneración centrolobular de las células hepáticas (51).

Toxicidad en aves de corral.

En las aves de corral, la anorexia se acompaña por una reducción en el desarrollo. Suceden hemorragias subcutáneas (52). Contraria a la situación en mamíferos, el hígado de las aves de corral sufriendo aflatoxicosis, no muestra fibrosis. La degeneración de las células del parénquima hepático es particularmente notorio acompañado por regeneración activa mediante la proliferación del epitelio de los conductos biliares de las regiones periportales. Los riñones se congestionan; muestran múltiples hemorragias; en el pavo joven se presenta nefritis glomerular, pero no en los patos jóvenes (53).

En los patos jóvenes una sola dosis de aflatoxinas es suficiente para obtener rápida proliferación que alcanza su máximo después de tres días. Después de treinta días de tratamiento con aflatoxinas, el hígado se agranda y muestra un color café o grisáceo; la superficie presenta granulaciones irregulares.

En los pollos, una mínima dosis de 0.8 mg de aflatoxinas por kilogramo se requiere para producir desórdenes hepáticos primarios (54).

Toxicidad en conejos.

El conejo, después de la ingestión de aflatoxinas muestra una degeneración grasa extensiva del parénquima hepático; las células se hinchan y muestran cambios nucleares. Se observa proliferación de células del tejido periportal y de los conductos biliares (55).

Toxicidad en cobayos.

Los cobayos responden a la toxicosis aguda en una forma análoga a los patos jóvenes. Una dieta conteniendo 1.4-1.6 mg de aflatoxina

por kilogramo es letal dentro de las tres semanas. Dosis más bajas permiten, desde luego, mayor tiempo de supervivencia pero causan severas lesiones en el hígado: necrosis centrolobular y proliferación masiva de células en los conductos biliares(56).

Toxicidad en ratas.

Las ratas pueden tolerar dosis mucho más altas de alimentos contaminados que los patos jóvenes. La rata es menos sensible a los efectos agudos de las aflatoxinas que muchos otros animales; el corazón, el bazo, el tracto intestinal y el tracto urogenital no se afectan (57). Sin embargo, los pulmones muestran lesiones macroscópicas grises con áreas de hemorragia. El hígado se ve afectado llegando incluso, a duplicar su tamaño y se observa la aparición de necrosis difusa en la región periportal (58).

Cuando a las ratas se les alimenta con 0.94 mg de aflatoxina B₁ por día durante 23 días, pueden detectarse hepatocitos de gran tamaño y de forma irregular (59). Además, en envenenamiento crónico se presentan lesiones testiculares y fusión de espermatozoides lo cual puede observarse dentro del primer mes de envenenamiento (60).

Toxicidad en perros.

La administración oral de alimento contaminado en dosis diarias de 1.5 y 20 microgramos por kilogramo por cinco días a la semana, durante un periodo de diez semanas arrojó los siguientes resultados (61):

MICROGRAMOS / KILOGRAMO	SINTOMAS
1	No mostraron síntomas
5	No mostraron síntomas
20	Pérdida del apetito. Orina amarillo-naranja. Incremento de protrombina. Acumulación de pigmentos biliares en las regiones portales.

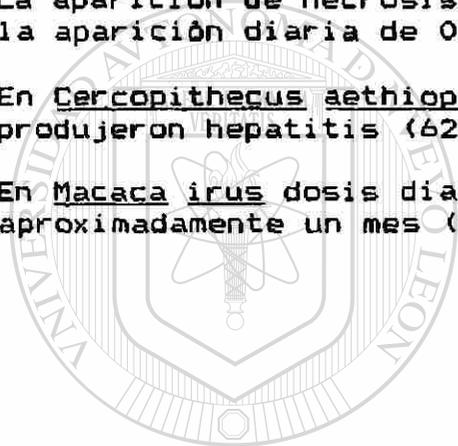
Toxicidad en monos.

La administración diaria de 1 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo a monos de dos a tres meses de edad produce alta mortalidad después de cuatro meses. Los exámenes post-mortem revelaron cambios hepáticos severos caracterizados por infiltraciones de grasas en la región de vena porta. Además se presentan cambios en las concentraciones de transaminasas y de bilirrubina (62).

La aparición de necrosis hepática en monos jóvenes se produce por la aparición diaria de 0.15-0.25 mg de aflatoxina por kilogramo.

En Cercopithecus aethiops, dosis diarias de 0.01-1 mg/Kg produjeron hepatitis (62).

En Macaca irus dosis diarias de 1.8 mg/Kg produjeron muerte en aproximadamente un mes (63).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

PROPIEDADES CARCINOGENICAS DE LAS AFLATOXINAS.

Hepatomas en la rata.

La alimentación de ratas con material conteniendo aflatoxinas provoca la aparición de carcinomas hepatocelulares multicéntricos en la mayoría de los casos. Los nódulos tumorales son amarillos-grisáceos o hemorrágicos y necróticos (64).

En la siguiente tabla puede observarse que la incidencia de tumores hepáticos en ratas es proporcional a la concentración de aflatoxinas en el alimento (65):

RELACION ENTRE LA CONCENTRACION DE AFLATOXINA, DETERMINADA POR FLUORESCENCIA Y LA INCIDENCIA DE TUMORES DE HIGADO EN RATA.

Concentración de aflatoxina en alimento. (mg/Kg)	Duración del Experimento. (Días)	Incidencia de de tumores de hígado.
5.0	370	14/15
3.5	340	11/15
3.5	335	7/10
1.0	294	5/9
1.0	323	8/15
0.2	360	2/10
0.2	361	1/10
0.005	384	0/10

Naturaleza Carcinogénica De Hepatomas Asociados Con Aflatoxinas:

Ha habido un creciente interés por conocer si los hepatomas causados por aflatoxinas son de naturaleza maligna.

Por definición, la propiedad de un cáncer es la posesión de caracteres invasivos no diferenciados y metastásicos (66).

Una proliferación anormal de células puede, ya sea proveer un tumor benigno formado de células idénticas no invasivas o proveer un tumor maligno de células no diferenciadas, algunas creciendo más rápidamente que otras.

En el caso de carcinoma de hígado, el diagnóstico es fácil si el tumor presenta metástasis o puede ser transplantado (67). En ausencia de estos dos criterios es posible usar una combinación de criterios microscópicos y macroscópicos.

Las aflatoxinas han sido útiles en el estudio de la naturaleza de las células cancerígenas. De hecho, la fase de inducción de carcinogénesis es muy breve, sobre todo cuando se aplica a animales jóvenes o a tejido de hígado en crecimiento, y la cantidad necesaria para la iniciación es muy pequeña: 5 microgramos por día por varios meses en la rata (68).

EFFECTOS BIOQUÍMICOS DE LAS AFLATOXINAS.

Se ha hecho énfasis acerca de que las aflatoxinas puedan considerarse como inhibidores biosintéticos, causando inhibición total y reducidas dosis lo hacen progresivamente afectando diferentes sistemas (69).

Se pueden mencionar las etapas sucesivas en la actividad biológica de las aflatoxinas sobre las células del hígado; siendo cada etapa una consecuencia de la etapa previa (70):

- 1.- Interacción con DNA e inhibición de las polimerasas responsables para la síntesis de DNA y RNA.
- 2.- Supresión de la síntesis de DNA.
- 3.- Reducción de la síntesis de RNA y la inhibición del RNA mensajero.
- 4.- Alteraciones de la morfología nucleolar.
- 5.- Reducción de la biosíntesis de proteínas.

Interacción con DNA.

La aflatoxina B₁ es la biológicamente más activa y su interacción ocurre preferencialmente con el anillo purínico de guanina (70). La aflatoxina también puede unirse con el DNA de una sola

hélice. Sin embargo, su unión es tan débil que el sólo hecho de pasarlo a través de una columna de sephadex se disocia el complejo. Estas interacciones pueden explicar la inhibición de la síntesis de DNA y RNA al mismo tiempo (71).

Supresión de la síntesis de DNA.

Los estudios de la supresión de la síntesis de DNA por aflatoxina B 1 se han hecho usando como base la estimulación de síntesis mediante hepatectomía. Por ejemplo, se probó que si la toxina se inyecta entre 30 a 60 microgramos /día durante los cinco días previos a la remoción quirúrgica de dos tercios del hígado ocurre una inhibición significativa de la síntesis de DNA (72). Si la toxina se inyecta 24 horas después de la remoción parcial del hígado, es decir, cuando han comenzado los procesos de regeneración celular, se ha encontrado que todos los procesos biosintéticos están bloqueados. Estos resultados se han confirmado usando ácido orótico marcado con carbono-14 (73).

Por otra parte, se ha demostrado que la aflatoxina B 1 inhibe la DNA polimerasa de E. coli en una manera análoga a la mitomicina C (74). La polimerasa se reduce un 60 % en su actividad.

Reducción en la síntesis de RNA.

Las aflatoxinas también pueden afectar la biosíntesis del RNA previniendo la transcripción del DNA por la RNA polimerasa (75). La actividad del RNA citoplásmico se inhibe totalmente, mientras que el RNA nuclear lo hace en menor escala. La biosíntesis del RNA nucleolar se inhibe en una etapa temprana. Después de tan sólo 15 minutos de haber hecho contacto con la aflatoxina, la biosíntesis se inhibe hasta en un 95 %.

Cambios en la morfología nucleolar.

Con una dosis intraperitoneal de 0.2 mg de aflatoxina B 1 por kilogramo en ratas macho tipo Fischer de 100 g de peso se han podido observar cambios ultraestructurales en los nucléolos de las células del hígado en un tiempo de tan sólo 36 horas (76).

Reducción de la biosíntesis de proteínas.

Los procesos de inhibición descritos anteriormente conducen finalmente a la reducción en la biosíntesis de proteínas.

La siguiente tabla muestra el efecto de la concentración de aflatoxina B 1 sobre la síntesis de DNA, RNA y proteína por Flavobacterium aurantiacum (77):

AFLATOXINA B 1 (microgramos/ml)	D N A (microgramos)	R N A (microgramos)	PROTEINA (microgramos)
0	33	70	190
10	27	60	190
25	21	60	180
50	0	60	170
100	0	50	165

LAS AFLATOXINAS Y SU RELACION CON EL HOMBRE.

Ha sido en Africa en donde se han presentado con mayor frecuencia casos que pudieran de alguna manera estar relacionados con la ingestión de aflatoxinas. Siendo este continente en cuyos alimentos, como el cacahuate y la harina de yuca, en donde han sido detectadas altas concentraciones de aflatoxinas como 1.7 mg/Kg.

La siguiente tabla muestra la diferencia que existe en la aparición de cáncer de hígado entre países desarrollados y algunos países de Africa. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

En las Filipinas se midió la presencia de aflatoxina M 1 en la orina de todos los niños que habían ingerido crema de cacahuate contaminada de aflatoxina B 1 a una concentración de 0.5 mg/Kg. (78).

CANCER DE HIGADO EN HUMANOS.

PAIS	CASOS POR CADA 100,000 HABITANTES.
Faises Bajos	1
Noruega	1
Canadá	1
Hawaii	9.7
Nigeria	9.8
Sudáfrica	19.2

Igualmente, en Uganda, en 1970 se detectò la muerte de un joven de 15 años de edad cuya autopsia revelò edema pulmonar, corazón dilatado y necrosis difusa centrolobular, todos estos síntomas asociados frecuentemente con aflatoxicosis. Otros miembros de la familia presentaron al mismo tiempo violentos dolores abdominales y la mayor parte de la dieta de la familia fue a base de yuca contaminada con 1.7 mg/kg (79).

En el sur y sureste de la República Mexicana es popular el uso de la yuca para la preparación de diversos platillos. Igualmente se emplea en la elaboración de harina.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTROL DE AFLATOXINAS EN VARIOS PAISES

Algunos países han impuesto regulaciones en torno al contenido de aflatoxinas en alimentos destinados tanto al consumo humano como animal. A continuación se muestran los límites máximos permisibles que algunos países han fijado para alimentos destinados al consumo humano (80).

PAIS	ALIMENTOS	LIMITES MAXIMOS DE B 1	AFLATOXINAS TOTALES			
			B1	B2	G1	G2
			microgramos/kilogramo			
ALEMANIA	TODOS	5				10
ARGENTINA	CACAHUATES	5				20
	MAIZ	5				20
BRASIL	TODOS	15				30
CANADA	TUDO TIPO DE NUECES	15				20
ESTADOS UNIDOS	TODOS					20
FRANCIA	TODOS					10
	ALIMENTOS INFANTILES					5
JAPON	TODOS	10				
MEXICO	TODOS					20
PAISES BAJOS	CACAHUATES	5				
POLONIA	TODOS					0
PORTUGAL	CACAHUATE	25				
	ALIMENTOS INFANTILES	5				
	OTROS	20				
RUMANIA	TODOS					0
SUDAFRICA	TODOS	5				10
ZIMBAWE	CACAHUATE	5				
	MAIZ	5				
	SORGO	5				

HIPOTESIS DEL TRABAJO:

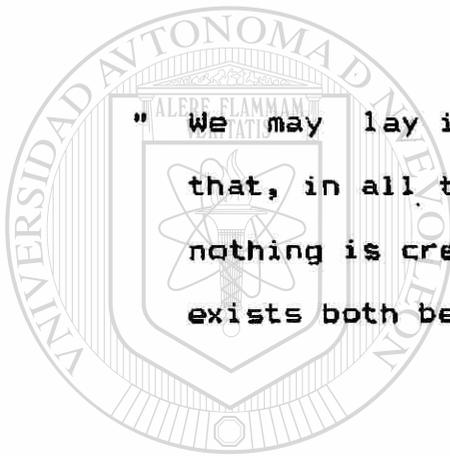
Debido a que las aflatoxinas y sus derivados absorben en la región del ultravioleta cercano y presentan fluorescencia, será posible llevar a cabo su identificación dentro de los rangos de interés toxicológico por métodos directos de absorción y/o fluorescencia después de una extracción adecuada de la muestra.

OBJETIVO GENERAL:

Utilizando la espectroscopia ultravioleta-visible y/o fluorescencia molecular, desarrollar un método que permita determinar el contenido de aflatoxinas en muestras alimenticias de alto consumo.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- 1.- Desarrollar un método para la determinación directa del contenido de aflatoxinas en extractos de alimentos por espectroscopia ultravioleta-visible.
- 2.- Desarrollar un método para la determinación directa del contenido de aflatoxinas en extractos de alimentos por fluorescencia molecular.
- 3.- Desarrollar un método eficiente para extracción de aflatoxinas en oleaginosas.
- 4.- Evaluar los métodos de los objetivos 1 y 2 en extractos de oleaginosas utilizando HPLC como técnica de referencia.



" We may lay it down as an incontestable axiom that, in all the operations of art and nature, nothing is created; an equal quantity of matter exists both before and after the experiment..."

Antoine Lavoisier

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN (France, 1789)

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



C A P I T U L O 2

MATERIALES Y METODOS

Introducción.

Este capítulo se ha dividido en dos partes: A y B. En la parte A se menciona la metodología que se llevó a cabo para la preparación de las soluciones normalizadas (estándares o patrón). En la parte B se mencionan los materiales usados y la metodología seguida tanto para el análisis cromatográfico por HPLC como para el análisis directo y, para ambos casos, los procedimientos de detección por fluorescencia molecular y absorción ultravioleta.

A continuación se hace una breve descripción acerca de lo que consistió la presente investigación.

Inicialmente se llevó a cabo la preparación y normalización de las soluciones patrón de aflatoxinas.

Una vez obtenidas las soluciones patrón se sometieron a evaluación los métodos directos de cuantificación: fluorescencia molecular y absorción ultravioleta. Después, se buscaron las condiciones cromatográficas por HPLC usando las dos modalidades de detección arriba mencionadas.

Posteriormente se desarrollaron métodos de extracción de aflatoxinas para muestras de maíz, cacahuate y nuez, y se comprobaron dichos métodos por HPLC.

Finalmente, se evaluaron comparativamente métodos usando separación por HPLC previa a la detección fisicoquímica versus métodos de cuantificación realizadas en forma directa después de la extracción de las muestras.

Parte A. Metodología para la preparación de soluciones patrón.

La preparación de las soluciones patrón de aflatoxinas constituye una parte esencial en la presente investigación, por ello se describe a continuación el procedimiento. Previamente a la normalización se procedió a determinar los criterios de pureza que deben cumplir las aflatoxinas de acuerdo con los procedimientos de la AOAC (81).

Criterios de pureza.

A).- Pureza cromatográfica.

B).- Absortividades molares dentro del límite de confianza de 95 %.

C).- Relaciones de los picos de absorción ultravioleta en metanol, dentro del límite de confianza de 95%.

A).-Determinación de pureza cromatográfica.

Se aplicaron en una placa cromatográfica cinco microlitros de una solución de referencia a intervalos de 2 cm. Se hizo un segundo sembrado de cinco microlitros para exclusivamente la solución de aflatoxinas, y adicionalmente en una tercera aplicación se incluyeron cinco microlitros de esta misma solución de aflatoxinas más cinco microlitros de la solución de referencia.

B).- Absortividades molares.

Una vez comprobada la pureza cromatográfica, se revisó que las absortividades molares de las aflatoxinas en metanol se encontrarán dentro de un 95% de los límites de confianza. Para cumplir con este requisito se usó el espectrofotómetro ultravioleta el cual requirió previa calibración de acuerdo a los procedimientos de la AOAC.

Calibración del espectrofotómetro: ®

La calibración del espectrofotómetro es indispensable en la preparación de las soluciones normalizadas. Para llevar a cabo la calibración se hizo lo siguiente:

i).- Se determinó la absorbancia de soluciones de dicromato de potasio a la longitud de onda de 350 nm, empleando como blanco una solución 0.018 N. de ácido sulfúrico.

ii).- Se calculó el coeficiente de extinción molar para tres concentraciones conocidas de dicromato de potasio (0.0625mM, 0.125mM, 0.250 mM)

iii).- Se calculó el promedio del coeficiente de extinción molar de las soluciones de dicromato de potasio.

iv).- Se determinó el factor de corrección del aparato y celdas, dividiendo el valor teórico del coeficiente de extinción molar del dicromato por el obtenido experimentalmente en el inciso anterior.

Determinación de la concentración de aflatoxinas.

La determinación de la concentración de aflatoxinas se llevó a cabo mediante la siguiente ecuación:

$$\text{microgramos/mililitro} = (A \times M \times 1000 \times CF) / E$$

Donde:

A : Absorbancia de la solución de aflatoxinas.

M : Peso molecular de la aflatoxina.

CF: Factor de corrección del instrumento y celdas.

E : Coeficiente de extinción molar de la aflatoxina a la longitud de onda de 350 nm.

El coeficiente de extinción molar de cada aflatoxina se obtuvo a partir de los datos publicados en el manual de la AOAC.

C).- Relaciones de los picos mayores de espectros de absorción ultravioleta en metanol.

Una vez revisados los valores de las absorptividades molares se comprobó que las relaciones de los picos mayores de los espectros de absorción ultravioleta de las aflatoxinas disueltas en metanol se encontraran dentro de un 95% de los límites de confianza a partir de espectros individuales.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Parte B. Materiales y metodología seguida en el análisis cromatográfico y directo.

La cromatografía es una técnica analítica cuyos fenómenos fisicoquímicos la han conducido más bien hacia una aplicación cuantitativa que hacia una cualitativa. Sin embargo, esto no quiere decir que la cromatografía carezca de importantes usos cualitativos. De hecho, es una técnica ampliamente usada en la identificación de mezclas de analitos mediante la adición de patrones conocidos. Por mencionar un ejemplo, durante la realización del presente trabajo, la identificación de aflatoxinas se hizo mediante la adición de patrones conocidos y, una vez identificados los analitos, se llevó a cabo la cuantificación.

Análisis Cualitativo.

La identificación de las aflatoxinas B 1, G 1, B 2 y G 2 se llevó a cabo, como ya se mencionó anteriormente, mediante la adición de patrones conocidos y, dado el caso, mediante los tiempos de retención relativos. Aparte de las aflatoxinas mencionadas y del ácido trifluoroacético usado como agente derivatizante, no se pretendió analizar otros compuestos que aparecieron en los cromatogramas como en el caso del maíz en donde aparecieron compuestos fluorescentes distintos de las aflatoxinas.

Análisis Cuantitativo.

Como se sabe, son variados los métodos que se siguen en las determinaciones cuantitativas por cromatografía. Ellos están en función de los recursos con los que se cuentan para llevarlas a cabo y desde luego, de las propiedades y comportamiento fisicoquímico de los analitos. A continuación se menciona el procedimiento usado en este trabajo para la cuantificación de aflatoxinas.

Para el registro de datos se contó con un registrador gráfico; por lo cual las determinaciones cuantitativas se elaboraron mediante cálculos manuales. Dado que las determinaciones se hicieron en base a los productos de derivatización en aquellas aflatoxinas susceptibles a esta reacción, se optó por preparar bajo las mismas condiciones tanto las muestras como a las soluciones normalizadas (estándares).

Se usó el método de patrón externo y para la integración de las áreas el criterio "valle-valle" (82). Los patrones externos se prepararon en rangos de concentración cercanos a las de las muestras y se inyectaron antes y después que éstas.

Para la medida de los picos se tomó en cuenta la altura y el ancho a la mitad de la altura del pico (82). En todos los casos se corrigieron las alturas en función de la sensibilidad del detector y la atenuación del registrador. Los volúmenes de inyección permanecieron constantes como se especifica más adelante.

INSTRUMENTACION.

MEDICIONES POR METODOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION. (HPLC).

Las separaciones cromatográficas mediante HPLC se hicieron con un cromatógrafo de líquidos Beckman-Altex (San Ramon, CA) modelo 334. Se usó una columna Varian (Palo Alto CA) Micropak MCH-5 de fase monomérica C-18 unida a sílica irregular de 60 angstroms (5 μ m), 4 mm de diámetro interno x 30 cm de longitud a temperatura ambiente.

Los cromatogramas se graficaron en un registrador Keep & Zonen (Holland), modelo BD 40 de 130 ma. y 50/60 Hz.

Condiciones cromatográficas.

La fase móvil usada fue una mezcla de MeOH + H₂O (45+55). La velocidad de flujo fue de 1 ml/min. El volumen de inyección se mantuvo constante en 20 microlitros para todas las determinaciones. Los cromatogramas se registraron a una velocidad de 2 mm/min.

Detección por fluorescencia molecular.

Para las determinaciones del maíz se usó un detector de fluorescencia Turner (Palo Alto, CA), modelo 111 provisto con filtros de excitación a 365 nm y de emisión a 436 nm.

Para las determinaciones del cacahuate y nuez se usó un detector de fluorescencia Beckman (San Ramon, CA), modelo 157 provisto con filtros de excitación a 365 nm y de emisión a 450 nm. La equivalencia de las unidades del rango de fluorescencia fueron como sigue:

1 R.F.U. = 10 mv.

9

Detección por absorción ultravioleta.

La detección por U.V. se hizo solamente para soluciones normalizadas de aflatoxinas (estándares) con la finalidad de calcular los límites de detección. Se usó un detector Varian modelo Star 9050 de longitud de onda variable, la cual se fijó a 365 nm.

MEDICIONES POR METODOS DIRECTOS.

Detección por fluorescencia molecular.

Las detecciones por fluorescencia molecular se hicieron con un fluorímetro Karl Zeiss (Deutschland) PMQ III provisto con filtro de excitación a 365 nm y con longitud de onda variable para la emisión, usándose a 435. Para la evaluación del fondo de fluorescencia, las lecturas se hicieron a la lambda de emisión de 455 nm.

Detección por absorción ultravioleta.

La detección por U.V. se hizo solamente para soluciones normalizadas de aflatoxinas (estándares) con la finalidad de calcular los límites de detección. Se usó un espectrofotómetro Beckman modelo 35 de longitud de onda variable, la cual se fijó a 365 nm.

Otros materiales usados en la metodología de trabajo.

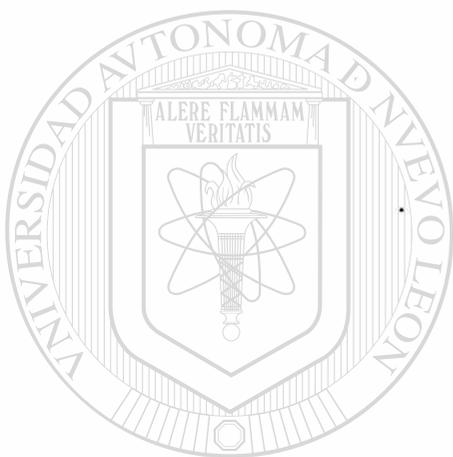
Las extracciones de las aflatoxinas a partir de las muestras de laboratorio de 10 g se hicieron usando un vaso de licuadora de 250 ml. La característica que reúne el vaso es que cierra junto con la base de las aspas.

En todos los casos en que se aplicó vacío, este se hizo usando una bomba de motor eléctrico monofásico a 1740 rpm de 7.7 amperes.

Para el caso de la limpieza de las muestras de maíz por extracción en fase sólida, las columnas utilizadas fueron de vidrio cuyas dimensiones fueron las siguientes: 30 cm de altura a partir de la base de vidrio poroso y 6 cm desde éste hasta la punta inferior. El diámetro interno fue de 1 cm. Tanto por arriba como por debajo de la fase C-18 se colocó fibra de vidrio, lo mínimo necesario para formar una capa delgada de 2 mm de ancho.

Derivatización de las aflatoxinas.

Las muestras se derivatizaron mediante la adición de 0.2 ml. de ácido trifluoroacético. Posteriormente las muestras derivatizadas fueron llevadas a sequedad y recuperadas con volumen conocido de MeOH + H₂O (1+9). Los volúmenes se especifican en cada una de las determinaciones que se muestran en la sección de cálculos para maíz, cacahuete y nuez.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

METODOS QUE FUERON PROBADOS PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS
A PARTIR DE MUESTRAS DE MAIZ.

METODO DENOMINADO: HEX-ETER-CLOR.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de maíz de malla No. 20 se tomaron 50 g y se introdujeron dentro de una columna de vidrio a manera de empaque. Luego se adicionó hexano hasta que ya no eluyera de color amarillo con la finalidad de solubilizar la mayor cantidad de las grasas; esto representó aproximadamente un volumen de 350 ml. Después se adicionaron 100 ml. de éter etílico con la finalidad de extraer otros componentes que no son de interés. Posteriormente se adicionó cloroformo hasta que su elución fuera incolora; esto representó aproximadamente 350 ml.

El extracto cloroformico se llevó a sequedad a la temperatura de 35 °C. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml mediante cloroformo. El concentrado se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y se procedió a la derivatización, se filtró con membrana de 0.45 micras y se inyectó al cromatógrafo.

METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO PARA LA SEPARACION DE AFLATOXINAS
A PARTIR DE MUESTRAS DE MAIZ.

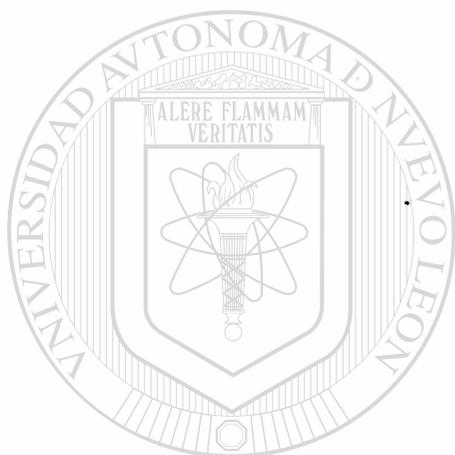
METODO DENOMINADO: LIQUIDO-LIQUIDO.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de maíz malla No. 20 se tomaron 10 g y se colocaron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se depositaron en el vaso 15 ml de agua destilada, la cual contenía 0.2 g de NaCl. Se dejó reposar cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 20 ml de hexano. Se agitó lentamente con la mano manteniendo cerrado el vaso con la finalidad de que se formara el equilibrio de fases y se evitara alguna explosión. Posteriormente se agitó a alta velocidad durante 3 minutos. Después se filtró el homogenato en embudo Buchner a través de papel filtro de poro ancho.

El filtrado se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 10 min. se tomaron 25 ml. de la fase inferior y se transfirieron a otro embudo de separación. A éste se adicionaron 25 ml. de cloroformo; se agitó con la finalidad de extraer las aflatoxinas. La capa inferior se recogió en un tubo de ensayo y se hizo pasar corriente de nitrógeno para evaporar el solvente. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml en el cual se llevó a sequedad. Se llevó a cabo la derivatización, la muestra se filtró en membrana de 0.45 micras y se inyectó en el cromatógrafo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EN BUSQUEDA DE UN METODO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS POR FASE SOLIDA INVERSA EN MUESTRAS DE MAIZ.
METODO DENOMINADO: DOS COLUMNAS.

PROCEDIMIENTO:

A partir de 1 Kg de maiz de malla número 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron 20 ml. de una mezcla de MeOH + H₂O (80+20) y se agitó por cinco minutos. Aproximadamente 8 ml del homogenato previamente filtrado por poro ancho, se transfirieron a la primera columna, la cual se acondicionó de la siguiente manera.

ACONDICIONAMIENTO DE LA PRIMER COLUMNA.-

Se pesaron 600 mg de fase inversa C-18 y se depositaron dentro de una columna. Posteriormente se adicionaron 6 ml de metanol y se eluyeron mediante bomba de succión pero sin dejar secar la fase; después se adicionaron 6ml de MeOH + H₂O (80 + 20) y se eluyeron. La fase no se dejó secar en ningún paso de elución. Posteriormente se adicionó el homogenato. Se eluyó la solución y se tomaron 4 ml. del eluido, los cuales se diluyeron mediante aforación a 10 ml. con agua destilada (no se usó agua desionizada debido al contenido de residuos orgánicos) Estos 10 ml se filtraron con membrana de 0.45 micras y se pasaron por una segunda columna sometida a diferente acondicionamiento.

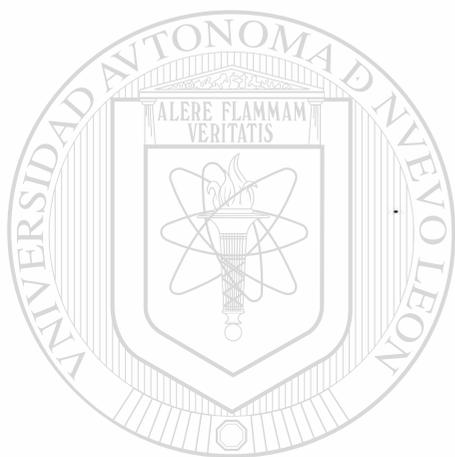
ACONDICIONAMIENTO DE LA SEGUNDA COLUMNA.

Se adicionaron 6 ml de metanol y se eluyeron; posteriormente se agregaron 6 ml de agua y se eluyeron también. Después se pasaron los 10 ml obtenidos, en porciones de 3 en 3 ml.

Posterior a la elución de los 10 mililitros, se adicionaron 6 ml de agua. Después se agregaron 2 ml de hexano sin dejar secar la columna y se eluyeron. La fase se secó por 15 minutos mediante bomba de succión. Para evitar oxidación de las toxinas por el oxígeno del aire, una corriente de nitrógeno se mantuvo por la parte superior de la columna.

Al término de los 15 minutos se llevó a cabo la elución de las aflatoxinas; para ello se adicionaron 4 ml de cloroformo repartidos en 3 alícuotas. La primera de ellas fue de 2 ml seguida por dos alícuotas

de 1 ml cada una (85). La elución se colectó en un tubo de ensayo colocado dentro de un matraz kitazato. Posteriormente se transfirió la solución a un vaso de 30 ml, en el cual, bajo corriente de nitrógeno se concentró la muestra a sequedad. Después de esto, se llevó a cabo el procedimiento de derivatización. La muestra ya derivatizada se filtró en membrana de 0,45 micras y se inyectó al cromatógrafo de líquidos.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

METODOLOGIA SEGUIDA PARA EVALUAR LA INFLUENCIA QUE EJERCEN SUSTANCIAS DIFERENTES DE LAS AFLATOXINAS B 1, G 1, G 2 Y B 2 EN LAS LECTURAS DIRECTAS POR FLUOROMETRIA PARA EL ANALISIS DE MUESTRAS DE MAIZ, USANDO COMO TECNICA DE REFERENCIA HPLC.

A fin de conocer la influencia que ejercen las sustancias diferentes de las aflatoxinas en las lecturas directas por fluorometria, se llevò a cabo el experimento cuya metodologia se describe a continuación.

Metodología.

Tres muestras de maíz fueron escogidas para realizar los ensayos.

Las muestras se denominaron: Maíz blanco No.1, Maíz blanco No. 2 y Maíz amarillo.

Cada una de las muestras se sometió al mismo tratamiento de extracción en fase sólida, el cual ya se ha descrito anteriormente. (En adelante a este procedimiento de extracción se le llamará SPE).

El tratamiento de cada muestra se hizo como a continuación se describe:

Maíz solo.

Sometida al procedimiento SPE y cuya recuperación se hizo en un volumen final de 2 ml. de una mezcla MeOH + H₂O (1+9).

B) Maíz + Aflatoxinas.

Muestra de maíz más enriquecimiento con 5 ng/g de cada una de las aflatoxinas B 1, G 2 y B 2. Sometida al tratamiento SPE y cuya recuperación se hizo en un volumen final de 2 ml. de una mezcla MeOH + H₂O (1+9). No se hizo derivatización.

C) Maiz + Aflatoxinas + TFA.

Muestra de maiz más enriquecimiento con 5 ng/g de cada una de las aflatoxinas B 1, G 2 y B 2. Sometida al tratamiento SPE y cuya recuperación se hizo en un volumen final de 2 ml. de una mezcla MeOH + H₂O (1+9). Se llevó a cabo el procedimiento de derivatización para incrementar la fluorescencia de B 1.

Formas de análisis.

I. METODO POR FLUORESCENCIA DIRECTA.

II. METODO DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

I. Método de fluorescencia directa. Las mediciones se hicieron comparándose contra un blanco de referencia constituido por una solución de MeOH + H₂O (1+9).

II. Método de fluorescencia por HPLC. El método usado para la cuantificación fue a base de pesadas en balanza analítica. Los picos correspondientes a los metabolitos y a las aflatoxinas se recortaron y se pesaron. Lo mismo se hizo para el fondo de fluorescencia. El peso total del cromatograma se tomó como el 100% y el porcentaje de cada componente se extrapolo a las lecturas directas.

PROCEDIMIENTO EMPLEADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE CACAHUATE.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg. de cacahuate de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml de agua destilada la cual contenia 0.2 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar por cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 20 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso con la finalidad de que se formara el equilibrio de fases y se evitara alguna explosión. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner, a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml. de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml. de cloroformo. Se agitó con la mano durante un minuto. Se colectó la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MÉTODOS QUE FUERON PROBADOS PARA LA EXTRACCIÓN DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE NUEZ.

MÉTODO: LIQUIDO-LIQUIDO.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de nuez de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml de agua destilada la cual contenía 0.3 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar por cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 30 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml de cloroformo y se agitó con la mano por un minuto. Se recogió la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml, en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

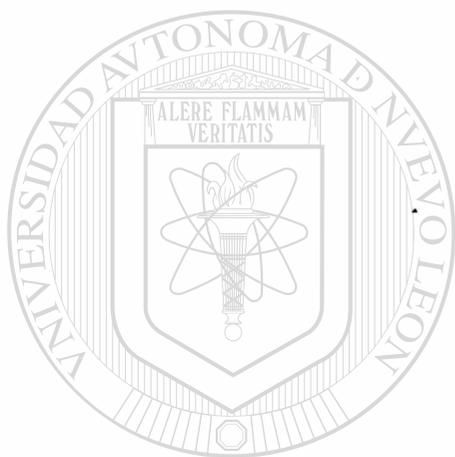
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
MÉTODO: LIQUIDO-LIQUIDO ADICIONANDO 20 ML MAS DE AGUA. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Procedimiento.

A partir de 1 Kg de nuez de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron a un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml de agua destilada la cual contenía 0.3 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 50 ml de agua y 30 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml de cloroformo y se agitó con la mano por un minuto. Se recogió la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml, en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

METODO PROBADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE NUEZ.

METODO DENOMINADO: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

Procedimiento.

A partir de 1 Kg. de nuez de malla No. 20 se tomaron 10 g y se introdujeron en un vaso de licuadora de 250 ml. Posteriormente se adicionaron al vaso 15 ml. de agua destilada la cual contenia 0.3 g de NaCl. La mezcla se dejó reposar por cinco minutos. Enseguida se adicionaron 65 ml de metanol, 30 ml de agua y 30 ml de hexano. Se agitó con la mano manteniendo cerrado el vaso con la finalidad de que se formara el equilibrio de fases y se evitara alguna explosión. Luego se agitó a alta velocidad por 3 minutos. El homogenato se filtró en embudo Buchner a través de papel de poro ancho.

Una vez filtrado el homogenato, la solución se transfirió a un embudo de separación de 250 ml. Después de 15 minutos, una vez que se separaron las fases, se tomaron 25 ml de la fase inferior y se vaciaron a otro embudo de separación. Posteriormente se adicionaron 25 ml de una mezcla de cloroformo y tetracloruro de carbono (15 + 10). Se agitó con la mano durante 1 minuto. Se recogió la fase inferior en un tubo de ensayo y se concentró mediante corriente de nitrógeno. El concentrado se transfirió a un vaso de 30 ml, en el cual se llevó a sequedad. El residuo se derivatizó, se filtró y se inyectó en el cromatógrafo.

A partir de este ejemplo, se ha construido la siguiente ecuación para el porcentaje de recuperación en muestras de MAIZ.

$$(H_m) (B_m) (C_s) (1/H_s B_s) (V) (5) (1/10) (100 / E) = \%$$

Donde:

H_m : Altura del pico de la aflatoxina cuyo porcentaje de recuperación se desea conocer.

B_m : Ancho de la base a la mitad de la altura del pico de la aflatoxina cuyo porcentaje de recuperación se desea conocer.

C_s : Concentración de solución normalizada (estándar).

B_s : Ancho de la base a la mitad de la altura del pico de la solución normalizada (estándar).

H_s : Altura del pico de la solución normalizada (estándar).

V : Volumen de recuperación de la muestra

5 : Valor que corresponde a la quinta parte (4 ml.) del total (20 ml.) del volumen de extracción.

1/10: Valor que convierte el total de aflatoxina en aflatoxina/gramo de muestra.

100 : Valor de referencia al 100%.

E : La cantidad en ng de aflatoxina/gramo de muestra con que se enriqueció la muestra analizada.

Cálculos para el porcentaje de recuperación de Aflatoxinas.
Aflatoxina B 1:

H_m : 1 cm. **B_s** : 0.2 cm.

B_m : 0.2 cm, **V** : 2 ml.

C_s : 63 ng/ml **E** : 4 ng/g

H_s : 18.5 cm.

$$(1 \text{ cm}) (0.2) (63) [1 / (18.4) (0.2)] (2 \text{ ml.}) (5) (1/10) (100/4) = 85.6 \%$$

Aflatoxina G 1:

H_m: 1.8 cm. **B_s**: 0.2 cm

B_m: 0.2 cm **V** : 2 ml.

C_s: 57.5 ng/ml. **E**: 7 ng/g

H_s: 16.5 cm.

$$(1.8) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/7) = 89.6 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 8.5 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 2 ml.
Cs: 14 ng/ml E: 80 ng/g
Hs: 1.7 cm

$$(8.5) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/80) = 87.5 \%$$

Aflatoxina B 2 :

Hm: 7.7 cm Bs: 0.3 cm
Bm: 0.3 cm V: 2 ml.
Cs: 18 ng/ml E: 60 ng/g
Hs: 2.5 cm

$$(7.7) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (2) (5) (1/10) (100/60) = 92.4 \%$$

MUESTRA: BLANCO PARA EVALUAR LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS
SIN EMPLEAR MAIZ (FIG. 13).

Se supuso una contaminación equivalente a :

G 1: 10 ng/g G 2: 70 ng/g
B 1: 4 ng/g B 2: 50 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas:

Aflatoxina G1 :

Hm: 2.4 cm. Bs: 0.2cm
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 10 ng/g.
Hs: 16.5 cm.

$$(2.4) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/10) = 83.6 \%$$

Aflatoxina B1:

Hm: 1 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 4 ng/g.
Hs: 18.5 cm

$$(1) (0.2) (63) [1 / (18.5) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/4) = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 7.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 70 ng/g.
Hs: 1.7 cm

$$(7.5) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/70) = 88.2 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 6.4. Bs: 0.3 cm
Bm: 0.3 cm. V: 2 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 50 ng/g.
Hs: 2.5 cm.

$$(6.4) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (2) (5) (1/10) (100/50) = 92.1\%$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL USADO COMO CONTROL (FIG. 14).

Esta muestra no está enriquecida, sin embargo presentó contaminación natural de aflatoxinas, por ello a continuación se exponen los cálculos para encontrar la concentración de cada una.

En los siguientes cálculos se incluirá el valor de P.R.

Donde: P.R. = Porcentaje de recuperación promedio obtenido para cada aflatoxina.

La ecuación queda así:

$$(Hm) (Bm) (Cs) [1 / HsBs] (V) (5) (1/10) (100/P.R.) = ng/g$$

Aflatoxina G 1 :

Hm: 2 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 57.5 ng/g. P.R.: 92%
Hs: 16.5 cm.

$$(2) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/92) = 3.8 \text{ ng/g} *$$

* para efectos prácticos este valor se aproximó a 4.0 ng/g

Aflatoxina B 1 :

Hm: 8 cm. Bs: 0.2 cm.
Hm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 63 ng/ml. P.R.: 85 %
Hs: 7.4 cm.

$$(8)(0.2)(63)[1/(7.4)(0.2)](1)(5)(1/10)(100/85) = 40 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 2: No se detectò a la máxima sensibilidad del detector. (30 x 2 mv).

El límite de detección de G 2 (ver más adelante los cálculos), equivale a 1.0 ng de G 2 por gramo de muestra de maíz. De aquí se concluye que la muestra analizada contiene menos de 1.0 ng/g.

Aflatoxina B 2:

Hm: 3.8 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 1 ml.
Cs: 18 ng/ml P.R. 93.5 %
Hs: 2.5 cm.

$$(3.8)(0.3)(18)[1/(2.5)(0.3)](1)(5)(1/10)(100/93.5) = 14.6 \text{ ng/g.}^*$$

* para efectos prácticos, se aproximó a 15 ng/g.

MUESTRA: MAIZ AMARILLO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 15):

G 1: 12 ng/g. G 2: 75 ng/g
B 1: 2.5 ng/g B 2: 60 ng/g

Debido a que la muestra control presentó contaminación natural de aflatoxinas, se introducirá en las ecuaciones la variable "Cn" cuando así sea necesario.

Cn: Contaminación natural en ng de aflatoxina por gramo de muestra.

Así, la ecuación quedará:

$$(Hm)(Bm)(Cs)[1/HsBs](V)(5)(1/10)[100/(Cn+E)] = P.R.$$

Aflatoxina G 1:

Hm: 8.1 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 12 ng/g
Hs: 16.5 cm. Cn: 4 ng/g

$$(8.1) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (1) (5) (1/10) [100 / (4+12)] = 88.2 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 8.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 2.5 ng/g
Hs: 7.4 cm. Cn: 40 ng/g

$$(8.5) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (1) (5) (1/10) [100 / (40+2.5)] = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 15.9 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 75 ng/g.
Hs: 1.7 cm. Cn: menos de 3.5 ng/g . Para efectos
de cálculos se consideró como cero.

$$(15.9) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/75) = 87.3\%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 19.5 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 1 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 60 ng/g.
Hs: 2.5 cm. Cn: 15 ng/g.

$$(19.5) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (1) (5) (1/10) [100 / (15+60)] = 93.6 \%$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL CON AFLATOXINAS (FIG. 16).

Cálculos para obtener los niveles de contaminación natural.

Aflatoxina G 1:

Hm: 0.6 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 57.5 ng/ml P.R. 92 %
Hs: 6.8 cm.

$$(0.6) (0.2) (57.5) [1 / (6.8) (0.2)] (1) (5) (1/10) (100/92) = 2.75 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 11 cm. Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm. V : 1 ml.
Cs: 63 ng/g P.R. 85 %
Hs: 7.4 cm

$$(11)(0.5)(63) [1 / (7.4)(0.5)] (1)(5)(1/10)(100/85) = 55.1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 1.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
Cs: 14 ng/ml. P.R.: 86.5 %
Hs: 1.7 cm

$$(1.5)(0.2)(14) [1 / (1.7)(0.2)] (1)(5)(1/10)(100/86.5) = 7.1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 2.5 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 1 ml.
Cs: 18 ng/ml. P.R.: 93.5 %
Hs: 2.5 cm

$$(2.5)(0.4)(18) [1 / (2.5)(0.4)] (1)(5)(1/10)(100/93.5) = 9.6 \text{ ng/g}$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL¹ CON AFLATOXINAS (FIG. 17).

Cálculos para obtener los niveles de contaminación natural.

Aflatoxina G 1:

Hm: 3.6 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. P.R. 92 %
Hs: 16.5 cm.

$$(3.6)(0.2)(57.5) [1 / (16.5)(0.2)] (3)(5)(1/10)(100/92) = 20.5 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 9.2 cm. Hs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 63 ng/ml. P.R.: 85 %
Hs: 7.4 cm.

$$(9.2) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/85) = 138.2 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 1.5 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 14 ng/ml. P.R.: 86.5 %
Hs: 1.7 cm.

$$(1.5) (0.3) (14) [1 / (1.7) (0.3)] (3) (5) (1/10) (100/86.5) = 21.5 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 8.7 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 18 ng/ml. P.R.: 93.5 %
Hs: 2.5 cm.

$$(8.7) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (3) (5) (1/10) (100/93.5) = 100.4 \text{ ng/g.}$$

MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL CON AFLATOXINAS (FIG. 18).

Cálculos para obtener los niveles de contaminación natural.

Aflatoxina G 1:

Hm: 3.3 cm. Bs: 0.2 cm.
Hm: 0.2 cm V: 3 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. P.R.: 92 %
Hs: 16.5 cm.

$$(3.3) (0.2) (57.5) [1 / (16.5) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/92) = 18.7 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 10.6 cm.
Bm: 0.2 cm.
Cs: 63 ng/ml.
Hs: 7.4 cm.

Bs: 0.2 cm.
V: 3 ml.
P.R.: 85 %

$$(10.6) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/85) = 159.2 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2 :

Hm: 1.6 cm.
Bm: 0.2 cm.
Cs: 14 ng/ml.
Hs: 1.7 cm

Bs: 0.2 cm.
V: 3 ml.
P.R.: 86.5 %

$$(1.6) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (3) (5) (1/10) (100/86.5) = 22.8 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2 :

Hm: 3.5 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 18 ng/ml
Hs: 2.5 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
P.R.: 93.5%

$$(3.5) (0.3) (18) [1 / (2.5) (0.3)] (3) (5) (1/10) (100/93.5) = 40.4 \text{ ng/g.}$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MUESTRA: MAIZ BLANCO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL USADO
COMO CONTROL (FIG. 19).

Esta muestra no está enriquecida, sin embargo presentó contaminación natural de aflatoxina B 1; es por ello que a continuación se presentan los cálculos para conocer los niveles de contaminación.

Aflatoxina G 1: No se detectó a la sensibilidad utilizada (30 x 5 mv); de acuerdo con el límite de detección se establece que su contenido es menor a 5 ng/g

Aflatoxina B 1:

Hm: 3.6 cm
Bm: 0.2 cm.
Cs: 63 ng/ml.
Hs: 7.4 cm

Bs: 0.2 cm.
V: 4 ml.
P.R.: 85 %

$(3.6) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (4) (5) (1/10) (100/85) = 72.1 \text{ ng/g}$

Aflatoxina G 2: No se detectó, la muestra tiene menos de 3.5 ng/g.

Aflatoxina B 2: No se detectó, la muestra tiene menos de 2.3 ng/g.

MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 20):

G 1: 12 ng/g G 2: 25 ng/g
B 1: 10 ng/g B 2: 52 ng/g

Cálculos para conocer los porcentajes de recuperación:

Aflatoxina G 1:

Hm: 1.3 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 12 ng/g.
Hs: 6.8 cm.

$(1.3) (0.2) (57.5) [1 / (6.8) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/12) = 91.6 \%$

Aflatoxina B 1:

Hm: 8.2 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 2 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 10 ng/g.
Hs: 7.4 cm Cn: 72 ng/g.

$$(8.2) (0.4) (63) [1 / (7.4) (0.4)] (2) (5) (1/10) [100 / (72+10)] = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 1.1 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 2 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 25 ng/g.
Hs: 0.7 cm.

$$(1.1) (0.2) (14) [1 / (0.7) (0.2)] (2) (5) (1/10) (100/25) = 88 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 2.4 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 2 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 52 ng/g.
Hs: 0.9 cm.

$$(2.4) (0.3) (18) [1 / (0.9) (0.3)] (2) (5) (1/10) (100/52) = 92.3 \%$$

MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 21).

G 1: 60 ng/g. G 2: 120 ng/g
B 1: 42 ng/g. B 2: 450 ng/g

Cálculos para conocer los porcentajes de recuperación.

Aflatoxina G 1:

Hm: 8.3 cm. Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 4 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 60 ng/g.
Hs: 16.5 cm

$$(8.3) (0.1) (57.5) [1 / (16.5) (0.1)] (4) (5) (1/10) (100/60) = 96.4 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.7 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 42 ng/g
Hs: 7.4 cm. Cn: 72 ng/g.

$$(5.7) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (4) (5) (1/10) [100 / (72+42)] = 85.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6.4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 120 ng/g.
Hs: 1.7 cm.

$$(6.4) (0.2) (14) [1 / (1.7) (0.2)] (4) (5) (1/10) (100/120) = 87.8 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 10.3 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 4 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 450 ng/g
Hs: 0.9 cm.

$$(10.3) (0.3) (18) [1 / (0.9) (0.3)] (4) (5) (1/10) (100/450) = 91.5 \%$$

MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 22).

G 1: 60 ng/g. G 2: 130 ng/g.
B 1: 35 ng/g. B 2: 500 ng/g.

Aflatoxina G 1:

Hm: 3.3 cm. Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 4 ml.
Cs: 57.5 ng/ml. E: 60 ng/g.
Hs: 6.8 cm.

$$(3.3) (0.1) (57.5) [1 / (6.8) (0.1)] (4) (5) (1/10) (100/60) = 93 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.3 Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 63 ng/ml. E: 35 ng/g.
Hs: 7.4 cm. Cn: 72 ng/g.

$$(5.3) (0.2) (63) [1 / (7.4) (0.2)] (4) (5) (1/10) [100 / (72+35)] = 84.3 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 2.8 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 4 ml.
Cs: 14 ng/ml. E: 130 ng/g
Hs: 0.7 cm.

$$(2.8) (0.2) (14) [1 / (0.7) (0.2)] (4) (5) (1/10) (100/130) = 86.1 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 12 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 4 ml.
Cs: 18 ng/ml. E: 500 ng/g
Hs: 0.9 cm.

$$(12) (0.3) (18) [1 / (0.9) (0.3)] (4) (5) (1/10) (100/500) = 96 \%$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



METODOLOGIA SEGUIDA EN LOS CALCULOS PARA OBTENER PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE CACAHUATE.

La ecuación que se usa para el cálculo de los porcentajes de recuperación de aflatoxinas para el cacahuete incorpora la constante del factor de dilución el cual corresponde a:

$$F.D. = 130/25 = 5.2$$

Donde: 130 : volumen total ocupado por los solventes usados en la extracción.

25 : volumen de la alicuota que se ocupa del volumen total de solventes.

Cálculos para determinar la concentración de aflatoxinas en la muestra usada como control.

MUESTRA DE CACAHUATE USADA COMO CONTROL (FIG. 23):

Aflatoxina G 1:

Hm: 5 cm.

Bm: 0.1 cm.

Cs: 5.7 ng/ml.

Hs: 10.8 cm.

Bs: 0.1 cm.

V: 1 ml.

$$(5)(0.1)(5.7)[1/(10.8)(0.1)](1)(5.2)(1/10) = 1.3 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 4 cm.

Bm: 0.2 cm.

Cs: 0.55 ng/ml.

Hs: 2 cm.

Bs: 0.2 cm.

V: 1 ml.

$$(4)(0.2)(0.55)[1/(2)(0.2)](1)(5.2)(1/10) = 0.5 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 4 cm.

Bm: 0.2 cm.

Cs: 6.5 ng/ml

Hs: 14 cm

Bs: 0.2 cm.

V: 1 ml.

$$(4)(0.2)(6.5)[1/(14)(0.2)](1)(5.2)(1/10) = 0.96 \text{ ng/g.}$$

Aprox: 1 ng/g.

Aflatoxina B 2:

Hm: 5.8 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 1 ml.
Cs: 0.51 ng/ml.
Hs: 2 cm.

$$(5.8) (0.3) (0.5) [1 / (2) (0.3)] (1) (5.2) (1/10) = 0.75 \text{ ng/g.}$$

Aprox: 0.8 ng/g.

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 24):

G 1: 15 ng/g. G 2: 20 ng/g.
B 1: 10 ng/g. B 2: 15 ng/g.

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina G 1 :

Hm: 6.7 cm Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.7 ng/ml. E: 15 ng/g.
Hs: 4.3 cm. Cn: 1.3 ng/g.

$$(6.7) (0.1) (5.7) [1 / (4.3) (0.1)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (15+1.3)] = 84.9 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 9.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.5 ng/ml. E: 10 ng/g.
Hs: 8.8 cm. Cn: 0.5 ng/g.

$$(9.5) (0.2) (5.5) [1 / (8.8) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (10+0.5)] = 88.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 10.4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 6.5 ng/ml. E: 20 ng/g.
Hs: 5.6 cm. Cn: 1 ng/g.

$$(10.4) (0.2) (6.5) [1 / (5.6) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (20+1)] = 89.6 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 13.3 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.1 ng/ml. E: 15 ng/g
Hs: 8.1 cm. Cn: 0.8 ng/g.

$$(13.3) (0.3) (5.1) [1 / (8.1) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (15+0.80)] = 82.6\%$$

MUESTRA : CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 25):

G 1: 60 ng/g. G 2: 120 ng/g
B 1: 50 ng/g B 2: 70 ng/g

Calculos para encontrar los porcentajes de recuperaci3n.

Aflatoxina G 1:

Hm: 6.6 cm. Bs: 0.1 cm.
Bm: 0.1 cm. V: 3 ml.
Cs: 57 ng/ml. E: 60 ng/g
Hs: 10.8 cm. Cn: 1.3 ng/g

$$(6.6) (0.1) (57) [1 / (10.8) (0.1)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (60+1.3)] = 88.6 \%$$

Aflatoxina B 1:

Hm: 10.4 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.5 ng/ml E: 50 ng/g
Hs: 2.2 cm Cn: 0.5 ng/g

$$(10.4) (0.2) (5.5) [1 / (2.2) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (50+0.5)] = 80.3 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 15.3 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 65 ng/ml. E: 120 ng/g
Hs: 14 cm Cn: 1 ng/g.

$$(15.3) (0.3) (65) [1 / (14) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (120+1)] = 91.6\%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 16.1 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 3 ml.
Cs: 5.1 ng/ml. E: 70 ng/g
Hs: 2 cm. Cn: 0.8 ng/g

$$(16.1) (0.4) (5.1) [1 / (2) (0.4)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (70+0.8)] = 90.4 \%$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 27):

B 1: 110 ng/g G 2: 172 ng/g B 2: 150 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación:

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.5 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 100 ng/ml. E: 110 ng/g
Hs: 8.7 cm. Cn: 0.5 ng.

$$(5.5) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (110+0.5)] = 89.2\%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6.6 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 3 ml.
Cs: 200 ng/ml. E: 172 ng/g
Hs: 13.7 cm Cn: 1 ng/g

$$(6.6) (0.2) (200) [1 / (13.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (172+1)] = 86.8 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 7.1 cm, Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 30 ng/ml, E: 150 ng/g
Hs: 2.4 cm Cn: 0.8 ng/g

$$(7.1) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (150+0.8)] = 91.8$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 26):

B 1: 150 ng/g G 2: 250 ng/g B 2: 210 ng/g

Cálculos para encontrar el porcentaje de recuperación:

Aflatoxina B 1:

Hm: 7.1 cm.	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm.	V: 3 ml.
Cs: 100 ng/ml.	E: 150 ng/g
Hs: 8.7 cm.	Cn: 0.5 ng/g.

$$(7.1) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (150+0.5)] = 84.5\%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 9.5 cm.	Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm	V: 3 ml.
Cs: 200 ng/ml.	E: 250 ng/g
Hs: 13.7 cm.	Cn: 1 ng/g.

$$(9.5) (0.2) (200) [1 / (13.7) (0.2)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (250+1)] = 86.2 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 10.4 cm.	Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm.	V: 3 ml.
Cs: 30 ng/ml.	E: 210 ng/g
Hs: 2.4 cm	Cn: 0.8 ng/g.

$$(10.4) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.2) (1/10) [100 / (210+0.8)] = 96.2 \%$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 28):

B 1 : 32 ng/g G 2: 24 ng/g B 2: 20 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación.

Aflatoxina B 1:

Hm: 9 cm.	Bs: 0.2 cm.
-----------	-------------

Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
 Cs: 100 ng/ml. E: 32 ng/g
 Hs: 17.4 cm. Cn: 0.5 ng/g.

$$(9) (0.2) (100) [1 / (17.4) (0.2)] (1) (5.2) (1/10) [100 (32+0.5)] = 82.7 \%$$

Aflatoxina G 2 :

Hm: 4.8 cm Bs: 0.4 cm.
 Bm: 0.4 cm. V: 1 ml.
 Cs: 25 ng/ml. E: 24 ng/g.
 Hs: 3.2 cm Cn: 1 ng/g.

$$(4.8) (0.4) (25) [1 / (3.2) (0.4)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (24+1)] = 78.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 6.9 cm. Bs: 0.5 cm.
 Bm: 0.5 cm V: 1 ml.
 Cs: 20 ng/ml. E: 20 ng/g
 Hs: 4.2 cm Cn: 0.8 ng/g.

$$(6.9) (0.5) (20) [1 / (4.2) (0.5)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (20+0.8)] = 82.1 \%$$

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS (FIG. 29):

B 1: 15 ng/g G 2: 19 ng/g B 2: 15 ng/g

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
 Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación.

Aflatoxina B 1 :

Hm: 8.5 cm Bs: 0.2 cm.
 Bm: 0.2 cm. V: 1 ml.
 Cs: 10 ng/g. E: 15 ng/g.
 Hs: 3.5 cm. Cn: 0.5 ng/g.

$$(8.5) (0.2) (10) [1 / (3.5) (0.2)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (15+0.5)] = 81.4 \%$$

Aflatoxina G 2:

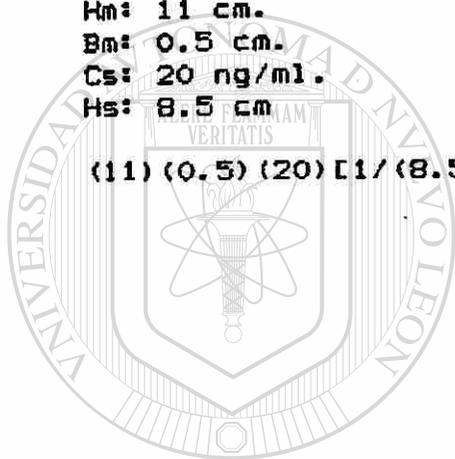
Hm: 16.4 cm.	Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm.	V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml.	E: 19 ng/g
Hs: 13 cm.	Cn: 1 ng/g.

$$(16.4) (0.4) (25) [1 / (13) (0.4)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (19+1)] = 82.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 11 cm.	Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm.	V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml.	E: 15 ng/g
Hs: 8.5 cm.	Cn: 0.8 ng/g.

$$(11) (0.5) (20) [1 / (8.5) (0.5)] (1) (5.2) (1/10) [100 / (15+0.8)] = 85.1 \%$$



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



METODOLOGIA SEGUIDA EN LOS CALCULOS PARA OBTENER LOS PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS EN MUESTRAS DE NUEZ.

MUESTRA: NUEZ SIN ENRIQUECER USADA COMO CONTROL.

OBSERVACION: La muestra no presentó contaminación natural de ninguna aflatoxina.

La ecuación que se usa para el cálculo de los porcentajes de recuperación de aflatoxinas para la nuez incorpora la constante del factor de dilución el cual corresponde a:

$$F.D. = 140/25 = 5.6.$$

Donde: 140 : Volumen total ocupado por los solventes usados en la extracción.

25 : Volumen de la alicuota que se ocupa del volumen total de solventes.

Debido a que la muestra que fue usada como control no presentó contaminación natural de aflatoxinas, a continuación se presentan las muestras que fueron enriquecidas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 33):

B 1: 15 ng/g

G 2: 20 ng/g

B 2: 16 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de las aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 8.4 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 10 ng/ml. E: 15 ng/g.
Hs: 3.5 cm

$$(8.4) (0.2) (10) [1 / (3.5) (0.2)] (1) (5.6) (1/10) (100/15) = 89.6 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 8.2 Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm. V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml. E: 20 ng/g.
Hs: 6.5 cm

$$(8.2) (0.4) (25) [1 / (6.5) (0.4)] (1) (5.6) (1/10) (100/20) = 88.3 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 11.1 cm. Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm. V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml. E: 16 ng/g .
Hs: 8.6 cm.

$$(11.1) (0.5) (20) [1 / (8.6) (0.5)] (1) (5.6) (1/10) (100/16) = 90.3 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 34):

B1: 30 ng/g G 2: 25 ng/g B 2: 20 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 16.8 cm Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm V: 1 ml.
Cs: 10 ng/ml. E: 30 ng/g.

Hs: 3.5 cm

$$(16.8) (0.2) (10) [1 / (3.5) (0.2)] (1) (5.6) (1/10) (100/30) = 89.6 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 9.1 cm. Bs: 0.4 cm.
Bm: 0.4 cm V: 1 ml.
Cs: 25 ng/ml. E: 25 ng/g.
Hs: 6.4 cm.

$$(9.1) (0.4) (25) [1 / (6.4) (0.4)] (1) (5.6) (1/10) (100/25) = 80.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 13.0 cm Bs: 0.5 cm.
Bm: 0.5 cm. V: 1 ml.
Cs: 20 ng/ml. E: 20 ng/g.
Hs: 8.6 cm.

$$(13.0) (0.5) (20) [1 / (8.6) (0.5)] (1) (5.6) (1/10) (100/20) = 85.0 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 35):

B 1: 110 ng/g G 2: 170 ng/g B 2: 150 ng/g

Cálculos para encontrar los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.2 cm. Bs: 0.2 cm.
Bm: 0.2 cm. V: 3 ml.
Cs: 100 ng/ml. E: 110 ng/g
Hs: 8.7 cm

$$(5.2) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.6) (1/10) (100/110) = 91.2 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6 cm. Bs: 0.3 cm.
Bm: 0.3 cm. V: 3 ml.
Cs: 200 ng/ml. E: 170 ng/g
Hs: 13.7 cm.

$$(6) (0.3) (200) [1 / (13.7) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/170) = 86.6 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 6.7 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 30 ng/ml
Hs: 2.4 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
E: 150 ng/g.

$$(6.7) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/150) = 93.8 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 36):

B 1: 160 ng/g

G 2: 270 ng/g

B 2: 240 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 7.3 cm.
Bm: 0.2 cm.
Cs: 100 ng/ml.
Hs: 8.7 cm.

Bs: 0.2 cm.
V: 3 ml.
E: 160 ng/g.

$$(7.3) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.6) (1/10) (100/160) = 88.1 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 9.8 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 200 ng/ml.
Hs: 13.7 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
E: 270 ng/g.

$$(9.8) (0.3) (200) [1 / (13.7) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/270) = 89.0 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 10.9 cm.
Bm: 0.3 cm.
Cs: 30 ng/ml.
Hs: 2.4 cm

Bs: 0.3 cm.
V: 3 ml.
E: 240 ng/g.

$$(10.9) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/240) = 95.4 \%$$

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS (FIG. 37):

B 1: 120 ng/g

G 2: 170 ng/g

B 2 : 160 ng/g

Cálculos para obtener los porcentajes de recuperación de aflatoxinas.

Aflatoxina B 1:

Hm: 5.5 cm.

Bs: 0.2 cm.

Bm: 0.2 cm.

V: 3 ml.

Cs: 100 ng/ml.

E: 120 ng/g.

Hs: 8.7 cm.

$$(5.5) (0.2) (100) [1 / (8.7) (0.2)] (3) (5.6) (1/10) (100/120) = 88.5 \%$$

Aflatoxina G 2:

Hm: 6.5 cm.

Bs: 0.3 cm.

Bm: 0.3 cm.

V: 3 ml.

Cs: 200 ng/ml.

E: 170 ng/g.

Hs: 13.7 cm

$$(6.5) (0.3) (200) [1 / (13.7) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/170) = 93.7 \%$$

Aflatoxina B 2:

Hm: 7.1 cm.

Bs: 0.3 cm.

Bm: 0.3 cm.

V: 3 ml.

Cs: 30 ng/ml.

E: 160 ng/g.

Hs: 2.4 cm.

$$(7.1) (0.3) (30) [1 / (2.4) (0.3)] (3) (5.6) (1/10) (100/160) = 93.1 \%$$

METODOLOGIA PARA LA EVALUACION DE LOS METODOS ANALITICOS

CALCULOS PARA OBTENER LOS LIMITES DE DETECCION DE LAS AFLATOXINAS

Definición.

Límite de detección. Es la mínima concentración de un analito a la cual el detector responde en forma directa a una señal equivalente al doble de su ruido.

MÉTODOS DE CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION (HPLC)

DETECCION POR FLUORESCENCIA MOLECULAR

MUESTRAS DE MAIZ .-

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x

Atenuación del registrador: 5 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Se seleccionó la muestra denominada "maíz amarillo contaminado en forma natural usado como control" que contenía 40 ng/g y cuya altura del pico fue de 8 cm. Se comparó con la muestra enriquecida de 2.5 ng/g de B 1, cuya altura fue de 8.5 cm. Así, se infiere que la altura remanente se debe al enriquecimiento:

Así, tenemos:

8.5 cm -- 8.0 cm = 0.5 cm ----> 2.5 ng/g

El doble del ruido: 0.1 cm ----> x = 0.5 ng/g. = Límite de detección.

A partir de este ejemplo se ha construido la siguiente ecuación para el cálculo de los límites de detección de aflatoxinas en maíz por HPLC-Fluorescencia.

$(C_m) (D) (1/H_a) = \text{Límite de detección.}$

Donde:

C_m : Concentración de la aflatoxina cuyo límite de detección se desea conocer.

H_a : Altura del pico de la aflatoxina cuyo límite de detección se desea conocer.

D : Doble del ruido del detector ante el cual se realizó el cromatograma.

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Maíz amarillo contaminado en forma natural usado como control" (FIG. 14).[®]

C_m : 4 ng/g.

H_a : 2 cm.

D : 0.2 cm.

$(4) (0.2) (1/2) = 0.4 \text{ ng / g}$

Aflatoxina G 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: " Maiz amarillo contaminado en forma natural "
(FIG. 16).

Cm: 7.1 ng/g.

Ha: 1.5 cm.

D: 0.2 mv.

$$(7.1) (0.2) (1/1.5) = 0.95 , \text{ Aprox. } 1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 30 x

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: " Maiz amarillo contaminado en forma natural "
(FIG. 16).

Cm: 9.6 ng/g.

Ha: 2.5 cm.

D: 0.2 cm.

$$(9.6) (0.2) (1/2.5) = 0.77 \text{ Aprox. } 0.8 \text{ ng/g.}$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MUESTRAS DE CACAHUATE

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Aflatoxina B 1 derivatizada

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 0.5 ng/g.

Ha: 4 cm.

D: 0.6 cm

$$(0.5) (0.6) (1/4) = 0.075 \text{ Aprox. } 0.08 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 1.3 ng/g

Ha: 5 cm.

Di: 0.6 cm.

$$(1.3) (0.6) (1/5) = 0.15 \text{ ng / g}$$

Aflatoxina G 2.

Condiciones de la muestra;

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 1 ng/g

Ha: 4 cm.

Di: 0.6 cm.

$$(1) (0.6) (1/4) = 0.15 \text{ ng / g}$$

Aflatoxina B 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 2 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Control" (FIG. 23).

Cm: 0.75 ng/g

Ha: 5.8 cm.

D: 0.6 cm.

$$(0.75) (0.6) (1/5.8) = 0.077 \text{ Aprox. } 0.08 \text{ ng/g}$$

MUESTRAS DE NUEZ.

Aflatoxina B 1 derivatizada

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05

Atenuación del registrador: 10 mv.

Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Muestra enriquecida" (FIG. 33).

Cm: 15 ng/g.

Ha: 8.4 cm.

D: 0.1 cm.

$$(15) (0.1) (1/8.4) = 0.18 \text{ ng / g.}$$

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Aflatoxina G 1 derivatizada.

A fin de obtener el límite de detección para la nuez, se tomó la relación de límites de detección entre B 1 y G 1 del cacahuete, la cual se expone a continuación:

$$G 1 / B 1 = 0.156 / 0.08 = 1.95 \text{ Aprox. } 2 \text{ ng/g.}$$

Así, el valor de 2 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera registrado a las siguientes condiciones:

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Límite de detección de B 1 a partir de nuez: 0.18 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $0.18 \times 2 = 0.36$ ng/g.

Aflatoxina G 2.

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Muestra enriquecida" (FIG. 33).

Cm: 20 ng/g.
Ha: 8.2 cm.
D: 0.1 cm.

$(20) (0.1) (1/8.2) = 0.24$ ng / g

Aflatoxina B 2

Condiciones de la muestra:

Sensibilidad del detector: 0.05
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Muestra seleccionada: "Muestra enriquecida" (FIG. 33).

Cm: 16 ng/g.
Ha: 11.1 cm
D: 0.1 cm.

$(16) (0.1) (1/11.1) = 0.14$ ng / g.

MÉTODOS DE CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC)

DETECCIÓN POR ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA

Los límites de detección para estándares se pueden observar a continuación. Sin embargo, si se quisieran conocer aquellos que se esperarían para muestras contaminadas de maíz, cacahuate y nuez, a continuación se presentan los cálculos sugeridos para ello.

LÍMITES DE DETECCIÓN QUE SE ESPERARÍAN PARA MAÍZ

Aflatoxina B₁

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 956 ng/ml.

Ha: 4.1 cm.

D: 0.5 cm.

Así, se obtiene:

$$(956) (0.5) (1/4.1) = 116.5 \text{ ng/ml} \quad \text{Valor del límite de detección para el estándar:}$$

L_s

A fin de calcular el límite de detección de la aflatoxina que sería obtenido a partir de muestras de maíz, se toma en cuenta el proceso de extracción y el porcentaje de recuperación como se indica a continuación.

Así, la ecuación queda:

$$(L_s) (F.D.) (V) (1/10) (100 / P.R.) = \text{Límite de detección sugerido.}$$

Sustituyendo:

$$(116.5 \text{ ng/ml}) (5) (1 \text{ ml}) (1/10 \text{ g}) (100/85) = 68.2 \text{ ng/g}$$

Valor del límite de detección para la aflatoxina.

Aflatoxina G 1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 658 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R. 92 %
D: 0.5 cm. F.D. 5

$$(658) (0.5) (1/4.1) = \text{Ls: } 80.2 \text{ ng/ml.}$$

$$(80.2) (5) (1) (1/10) (100/92) = 43.6 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 1020 ng/ml Ha: 10.2 cm P.R.: 86.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5

$$(1020) (0.5) (1/10.2) = 50 \text{ ng/ml}$$

$$(50) (5) (1) (1/10) (100/86.5) = 29 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B2

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 984 ng/ml. Ha: 10.6 cm P.R.: 93.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5

$(984) (0.5) (1/10.6) = 46.4 \text{ ng/ml.}$

$(46.4) (5) (1) (1/10) (100/93.5) = 25 \text{ ng/g.}$

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA CACAHUATE

Aflatoxina B1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 956 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R.: 84.2 %
D: 0.5 cm. F.D. 5.2

$(956) (0.5) (1/4.1) = 116 \text{ ng/ml.}$

$(116) (5.2) (1) (1/10) (100 / 84.2) = 71.6 \text{ Aprox. } 72 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 658 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R.: 92 %
D: 0.5 cm F.D.: 5.2

$(658) (0.5) (1/4.1) = 80.2 \text{ ng/ml.}$

$(80.2) (5.2) (1) (1/10) (100/92) = 45.3 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 2.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 1020 ng/ml. Ha: 10.2 cm P.R.: 86.5 %
D: 0.5 cm F.D.: 5.2

$(1020) (0.5) (1/10.2) = 50 \text{ ng/ml.}$

$(50) (5.2) (1) (1/10) (100/86.5) = 30 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina B 2.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 984 ng/ml. Ha: 10.6 cm P.R.: 93.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.2

$$(984) (0.5) (1/10.6) = 46.4 \text{ ng/ml}$$

$$(46.4) (5.2) (1) (1/10) (100/93.5) = 25.8 \text{ Aprox. } .26 \text{ ng/g.}$$

LIMITES DE DETECCIÓN QUE SE ESPERARIAN PARA NUEZ.

Aflatoxina B 1.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 956 ng/ml. Ha: 4.1 cm P.R.: 89.4 %
D: 0.5 cm F.D. 5.6

$$(956) (0.5) (1/4.1) = 116 \text{ ng/ml.}$$

$$(116) (5.6) (1) (1/10) (100/89.4) = 72.6 \text{ Aprox. } 73 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 1.

Si se asume que la relación de los límites de detección entre G 1 y B 1 se mantuviera igual en la nuez como en el cacahuate, tendríamos:

$$G 1 / B 1 = 45.3 / 72 = 0.63$$

Así, el valor de 0.63 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera registrado a las siguientes condiciones:

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Límite de detección de B 1 a partir de nuez: 73 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $73 \times 0.63 = 46 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 2.

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 1020 ng/g Ha: 10.2 cm P.R.: 86.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.6

$(1020) (0.5) (1/10.2) = 50 \text{ ng/ml.}$

$(50) (5.6) (1) (1/10) (100/86.5) = 32.4 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina B 2

Condiciones del estándar:

Sensibilidad del detector: 0.001
Atenuación del registrador: 10 mv.
Volumen de recuperación: 1 ml.

Estándar seleccionado (FIG. 5):

Cs: 984 ng/ml. Ha: 10.6 cm P.R.: 93.5 %
D: 0.5 cm F.D. 5.6

$(984) (0.5) (1/10.6) = 46.4 \text{ ng/ml.}$

$(46.4) (5.6) (1) (1/10) (100/93.5) = 27.8 \text{ Aprox. } 28 \text{ ng/g.}$

METODOS DE LECTURA DIRECTOS

DETECCION POR FLUORESCENCIA MOLECULAR

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA MUESTRAS DE MAIZ

Si se asume que no hubiera interferencia en la fluorescencia total causada por compuestos diferentes de las aflatoxinas, se procedería como a continuación se indica.

Para los cálculos se usaron las intensidades de fluorescencia de los estándares de aflatoxinas, el factor de dilución debido al procedimiento de extracción y el porcentaje de recuperación.

Condiciones generales a las cuales se midieron los estándares.

Sensibilidad del detector: 100×10

Slit: 0.5 mm.

Volumen de recuperación: 3 ml.

Trayecto óptico de celda: 1 cm.

Lambda de excitación: 365 nm.

Lambda de emisión: 436 nm.

Aflatoxina B₁ derivatizada.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. III):

Cs: 5 ng/ml.

D: 1.0

If: 10.5

F.D.: 5

P.R: 85 %

Donde If : Intensidad de fluorescencia del estándar.

Todos los demás términos han sido previamente definidos.

Así, se obtiene:

$(5) (1.0) (1 / 10.5) = 0.47 \text{ ng/ml}$ Limite de detección para el estándar.

A fin de calcular el límite de detección de la aflatoxina que sería obtenido a partir de muestras de maíz, se toma en cuenta el proceso de extracción y el porcentaje de recuperación como se indica a continuación:

$$(0.47) (5) (3) (1/10) (100/85) = 0.82 \text{ ng/g para maíz.}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. IV):

Cs: 5 ng/ml If: 9 P.R.: 92 %
D: 1 F.D.: 5

$$(5) (1) (1/9) = 0.55 \text{ ng / ml.}$$

$$(0.55) (5) (3) (1/10) (100/92) = 0.89 \text{ ng / g}$$

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. V):

Cs: 5 ng/ml If: 8.5 P.R.: 86.5 %
D: 1 F.D.: 5

$$(5) (1) (1/8.5) = 0.58 \text{ ng/ml.}$$

$$(0.58) (5) (3) (1/10) (100/86.5) = 1 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina B 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. VI):

Cs: 5 ng/ml. If: 22.5 P.R.: 93.5 %
D: 1 F.D.: 5

$$(5) (1) (1/22.5) = 0.22 \text{ ng/ml.}$$

$$(0.22) (5) (3) (1/10) (100/93.5) = 0.35 \text{ ng/g.}$$

LIMITES DE DETECCION PARA MUESTRAS DE CACAHUATE

Se contaminaron muestras de cacahuate con la finalidad de conocer los limites de detección de cada aflatoxina. Los niveles de contaminación se representan mediante Cm.

Condiciones generales a las cuales se hicieron las mediciones.

Sensibilidad del detector: 100 x 10.

Slit: 0.5 mm

Volumen de recuperación: 3 ml.

Trayecto óptico de celda: 1 cm.

Lambda de excitación: 365 nm.

Lambda de emisión: 436 nm.

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Cm: 10 ng/g

If: 11.5

D: 1

$$(10) (1) (1/11.5) = 0.87 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Cm: 10 ng/g

If: 11.0

D: 1

$$(10) (1) (1/11) = 0.90 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 2

Cm: 10 ng/g

If: 10

D: 1

$$(10) (1) (1/10) = 1 \text{ ng / g.}$$

Aflatoxina B 2.

Cm: 10 ng/g
If: 25.0
D: 1

$$(10) (1) (1/25) = 0.40 \text{ ng/g.}$$

LIMITES DE DETECCION PARA MUESTRAS DE NUEZ

Se contaminaron muestras de nuez con la finalidad de conocer los límites de detección de cada aflatoxina. Los niveles de contaminación se representan mediante Cm.

Condiciones generales a las cuales se hicieron las mediciones

Sensibilidad del detector: 100×10
Slit: 0.5 mm.
Volumen de recuperación: 3 ml.
Trayecto óptico de celda: 1 cm.
: Lambda de excitación: 365 nm.
Lambda de emisión: 436 nm.

Aflatoxina B 1 derivatizada.

Cm: 10 ng/g.
If: 10.5
D: 1

$$(10) (1) (1/10.5) = 0.95 \text{ ng/g}$$

Aflatoxina G 1 derivatizada.

Asumiendo que la relación de los límites de detección entre G 1 y B 1 se mantiene igual en la nuez que en el cacahuete, se tendría:

$$G 1 / B 1 = 0.90 / 0.87 = 1.03$$

Así, el valor de 1.03 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera sometido a las mismas condiciones que B 1 :

Límite de detección de B 1 a partir de nuez : 0.95 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $0.95 \times 1.03 \approx 0.98$ ng/g

Aprox.: 1 ng/g.

Aflatoxina G 2.

Cm: 10 ng/g.

If: 9.0

D: 1

$$(10) (1) (1/9) = 1.11 \text{ ng/g.}$$

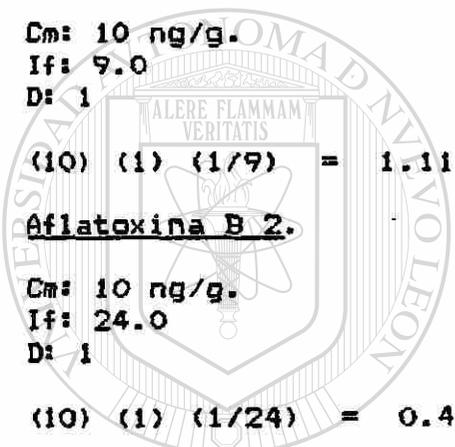
Aflatoxina B 2.

Cm: 10 ng/g.

If: 24.0

D: 1

$$(10) (1) (1/24) = 0.41 \text{ ng/g.}$$



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MÉTODOS DE LECTURA DIRECTOS

DETECCIÓN POR ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA

Los límites de detección para estándares se pueden observar a continuación. Sin embargo, si se quisieran conocer aquellos que se esperarían para muestras contaminadas de maíz, cacahuete y nuez, a continuación se presentan los cálculos sugeridos para ello.

Condiciones generales a las cuales se midieron los estándares.

Slit: 0.1 mm.

Volumen de recuperación: 3 ml.

Trayecto óptico de celda: 1 cm.

LÍMITES DE DETECCIÓN QUE SE ESPERARÍAN PARA EL MAÍZ.

Aflatoxina B₁.

Estándar seleccionado (APÉNDICE E, FIG. XI):

Cs: 320 ng/ml.
D: 0.004

As: 0.020
F.D. 5

P.R.: 85 %

Donde: As = Absorbancia del estándar.
Todos los demás términos han sido previamente
definidos.

Así, se obtiene:

$(320) (0.004) (1/0.020) = 64 \text{ ng/ml.}$ Valor del límite de detección para el estándar.

A fin de calcular el límite de detección de la aflatoxina que sería obtenido a partir de muestras de maíz, se toma en cuenta el proceso de extracción y el porcentaje de recuperación como se indica a continuación.

(64) (5) (3) (1/10) (100/85) = 113 ng/g

Aflatoxina G 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XII):

Cs: 345 ng/ml. As: 0.018 P.R. 92 %
D: 0.004 F.D. 5

(345) (0.004) (1/0.018) = 76.6 ng/ml.

(76.6) (5) (3) (1/10) (100/92) = 125 ng/g

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIII):

Cs: 380 ng/ml. As: 0.021 P.R. 86.5 %
D: 0.004 F.D. 5

(380) (0.004) (1/0.021) = 72.3 ng/ml.

(72.3) (5) (3) (1/10) (100/86.5) = 126 ng/g

Aflatoxina B 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XV):

Cs: 270 ng/ml As: 0.018 P.R. 93.5 %
D: 0.004 F.D. 5

(270) (0.004) (1/0.018) = 60 ng/ml.

(60) (5) (3) (1/10) (100/93.5) = 96 ng/g

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA EL CACAHUATE.

Aflatoxina B 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XI):

Cs: 320 ng/ml. As: 0.020 P.R. 85 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(320) (0.004) (1/0.020) = 64 ng/ml.

(64) (5.2) (3) (1/10) (100/85) = 118 ng/ml.

Aflatoxina G 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XII):

Cs: 345 ng/ml. As: 0.018 P.R. 92 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(345) (0.004) (1/0.018) = 76.6 ng/ml.

(76.6) (5.2) (3) (1/10) (100/92) = 130 ng/g.

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIII):

Cs: 380 ng/ml. As: 0.021 P.R. 86.5 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(380) (0.004) (1/0.021) = 72.3 ng/ml.

(72.3) (5.2) (3) (1/10) (100/86.5) = 130 ng/g

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Aflatoxina B 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIV):

Cs: 270 ng/ml. As: 0.018 P.R. 93.5 %
D: 0.004 F.D. 5.2

(270) (0.004) (1/0.018) = 60 ng/ml.

(60) (5.2) (3) (1/10) (100/93.5) = 100 ng/g.

LIMITES DE DETECCION QUE SE ESPERARIAN PARA LA NUEZ.

Aflatoxina B 1.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XI):

Cs: 320 ng/ml. As: 0.020 P.R. 85 %
D: 0.004 F.D. 5.6

$$(320) (0.004) (1/0.020) = 64 \text{ ng/ml.}$$

$$(64) (5.6) (3) (1/10) (100/85) = 127 \text{ ng/g.}$$

Aflatoxina G 1.

Si se asume que la relación de los límites de detección entre G 1 y B 1 se mantuviera igual en la nuez como en el cacahuate se tendría:

$$G 1 / B 1 = 130 / 118 = 1.10$$

Así, el valor de 1.10 se tomará como parámetro para referirlo al límite de detección de B 1 a partir de nuez. Suponiendo que G 1 se hubiera sometido a las mismas condiciones que B 1 :

Límite de detección de B 1 a partir de nuez: 127 ng/g.

Así, tendríamos para G 1 a partir de nuez: $127 \times 1.10 = 140 \text{ ng/g.}$

Aflatoxina G 2.

Estándar seleccionado (APENDICE E, FIG. XIII)

Cs: 380 ng/ml. As: 0.021 P.R. 86.5 %
D: 0.004 F.D. 5.6

$$(380) (0.004) (1/0.021) = 72.3 \text{ ng/ml.}$$

$$(72.3) (5.6) (3) (1/10) (100/86.5) = 140 \text{ ng/g.}$$

" Analytical chemistry, or the art of recognizing different substances and determining their constituents, takes a prominent position among the applications of the science, since the questions which it enables us to answer arise wherever chemical processes are employed for scientific or technical purposes. Its supreme importance has caused it to be assiduously cultivated from a very early period in the history of chemistry, and its records comprise a large part of the quantitative work which is spread over the whole domain of the science . "

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Wilhelm Ostwald

(1894)

CAPITULO 3

RESULTADOS Y DISCUSION

Discusión de procedimientos.

Varios procedimientos de derivatización han sido previamente publicados (11,96,97,98).

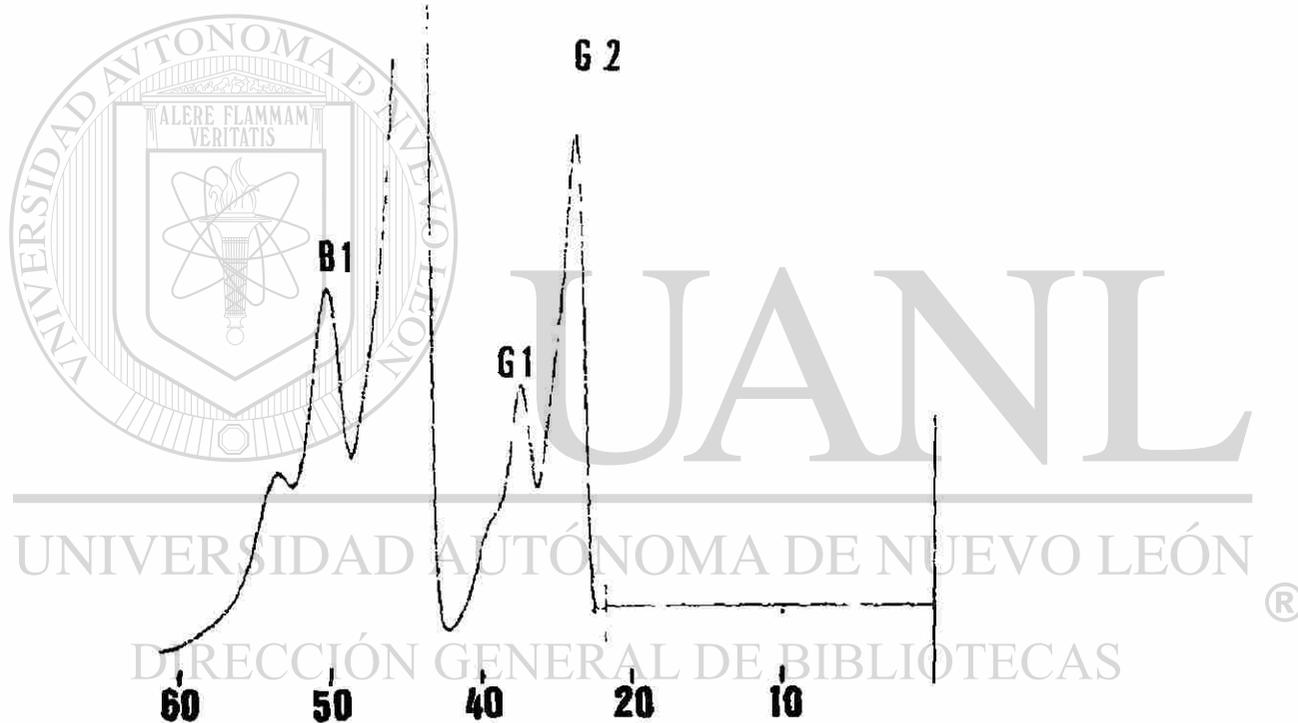
Las determinaciones hechas por HPLC usando la detección por fluorescencia fueron sometidas al procedimiento de derivatización (83) a fin de incrementar la fluorescencia de las aflatoxinas B 1 y G 1. La diferencia que existe en la intensidad es bastante notable (figs. 3 y 4). Para el caso de la detección por UV usando HPLC también se llevó a cabo la derivatización, pues aunque ésta no produce efecto alguno en la detección, sí produjo mejor resolución sobre los cromatogramas (Fig. 5).

Para las determinaciones directas por fluorescencia, en ocasiones se derivatizaron las aflatoxinas y en otras no, esto a fin de evaluar comparativamente la influencia que ejerce la derivatización en los límites de detección. Las determinaciones directas por UV no se sometieron a la derivatización, ya que ésta por razones obvias, no produce fenómeno alguno que origine un cambio significativo capaz de ser detectado en la región ultravioleta.

Aunque B 1 y G 1 derivatizadas se encuentran comercialmente disponibles, ninguna de las muestras que se usaron para obtener los porcentajes de recuperación se contaminaron con ellas, sino que se hicieron con aflatoxinas libres de la derivatización por la razón de que difieren en la polaridad, y así de este modo se evitaron mediciones de recuperación fuera de los objetivos de este trabajo.

MAIZ.

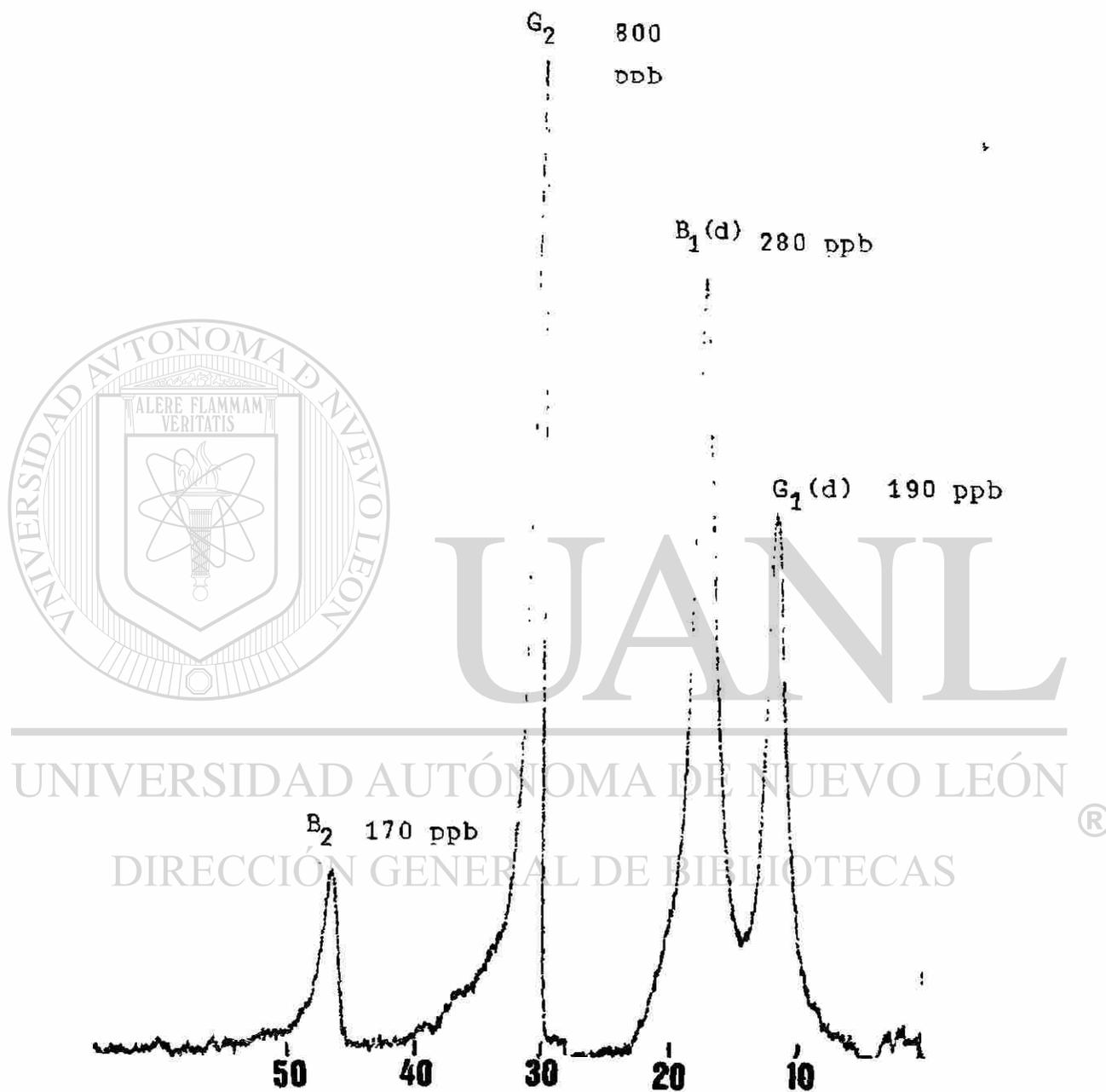
En la búsqueda por desarrollar un método adecuado para la preparación de muestras de maíz que reuniera las condiciones óptimas de análisis, se optó por tomar como punto de partida un método desarrollado previamente en nuestro laboratorio (83). Al llevar a cabo dicho método se encontró que presenta una serie de ventajas entre las cuales destaca el uso de un solo solvente como el cloroformo para la extracción de aflatoxinas. Adicionalmente se pudo constatar



**MUESTRA: CROMATOGRAMA DE LAS AFLATOXINAS
 G 1, B 1, G 2, B 2 SIN EL
 PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACION.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 OBSERVACION: NO HAY RESOLUCION TOTAL DE LOS ANALITOS**

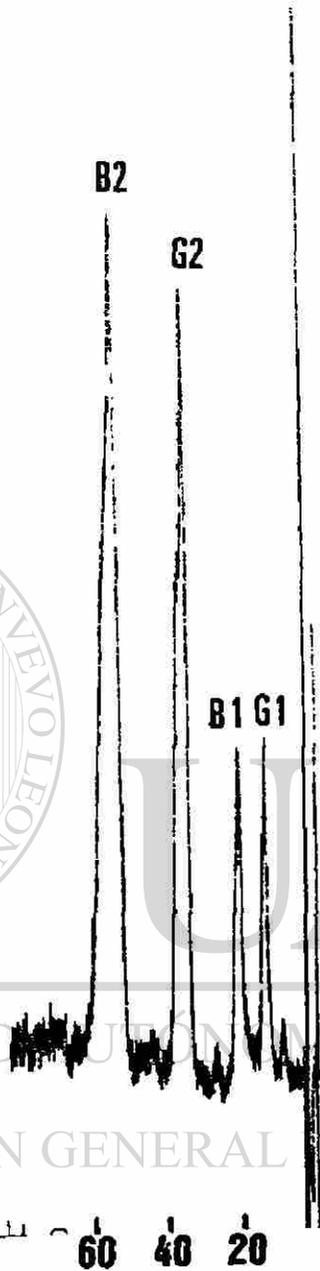
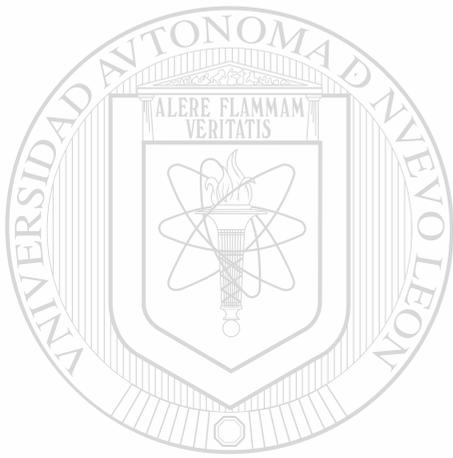
FIG. 3

SENSIBILIDAD: 10 x 5 mv.



MUESTRA: CROMATOGRAMA DE LAS AFLATOXINAS
G 1, B 1, G 2, B 2 CON EL
PROCEDIMIENTO DE DERIVATIZACION.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SE OBSERVA RESOLUCION DE LOS ANALITOS.

FIG. 4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MUESTRA: SOLUCIÓN NORMALIZADA DE AFLATOXINAS:
G 1: 658 NG/ML. B 1: 956 NG/ML.
G 2: 1,020 NG/ML. B 2: 984 NG/ML.
DETECCIÓN POR ABSORCIÓN ULTRAVIOLETA.
SENSIBILIDAD: 0.001 x 10 MV.
VELOCIDAD DE CARTA: 0.5 MM/MIN.

FIG. 5

que el proceso de extracción se ve favorecido por el contacto muy cercano que se produce entre la muestra y el solvente. Sin embargo, se observó que a pesar de que las aflatoxinas se solubilizaron en el cloroformo, también las grasas lo hicieron, de tal manera que el manejo de la solución se complicó, particularmente al pasar la solución de extracción a través de las membranas de filtración de 0.45 micras. Además, aunque no existirían problemas de detección de grasas debido a que no presentan fluorescencia, si se podrían presentar complicaciones en la columna analítica debidas a su acumulación ya que la mayoría de ellas posee menor polaridad que las aflatoxinas. Por ello se modificó el método haciendo una purificación de la muestra previa a la extracción de las toxinas. La refinación consistió en extraer los compuestos de polaridad diferente a la de los analitos de interés. Para ello se usaron hexano y éter etílico en el respectivo orden previamente a la adición de cloroformo.

A pesar de que la muestra de inyección obtenida fue más pura, los porcentajes de recuperación fueron muy bajos (tabla I) y los volúmenes de solventes resultaron grandes. Por ello se decidió cambiar la metodología ensayando un procedimiento de extracción que requiriera menor cantidad de muestra a fin de reducir los volúmenes de solventes.

Recientemente se reportó (84) que siguiendo el procedimiento CB de la AOAC (81), el uso de muestras analíticas de 10 g procedentes de muestras finamente molidas (malla No. 20) provee una varianza estadísticamente comparable con muestras de 50 g. Sin embargo, se ha demostrado (83) pérdidas en la recuperación de las toxinas causada por su retención en la tierra de diatomeas y la gel de sílice usadas en este método. Por ello, aunque se decidió usar muestras de 10 g, se consideró llevar a cabo un procedimiento de extracción diferente como lo es el líquido-líquido, mediante el cual se evitara el uso de adsorbentes.

Sin embargo, al llevar a cabo el método de extracción líquido-líquido, se pudo verificar que, aunque los cromatogramas reportaron reproducibilidad, no mostraron recuperación de las aflatoxinas G 1 y B 2 a los niveles de interés toxicológico (Figs. 6 y 7), por lo cual se decidió descartar este método.

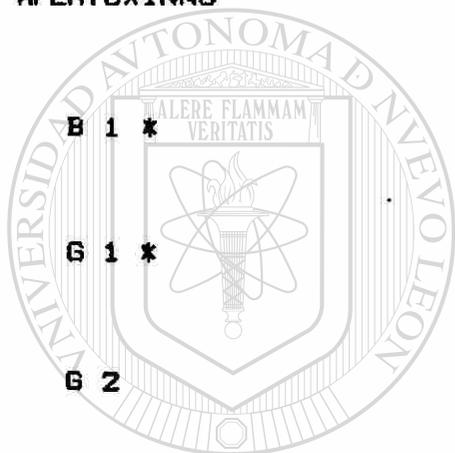
La búsqueda por desarrollar otros métodos condujo a indagar acerca del uso de columnas pequeñas rellenas de fase sólida. Estas columnas presentan ciertas ventajas como por ejemplo, el uso de reducidos volúmenes de solventes y corto tiempo en la preparación de las muestras, particularmente para su uso en el análisis de malz (9,91,92).

TABLA I.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DEL METODO HEX-ETER-CLOR USADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MAIZ.

AFLATOXINAS

PORCENTAJES DE RECUPERACION*



B 1 *

26.7 %

G 1 *

15.3 %

G 2

12.6 %

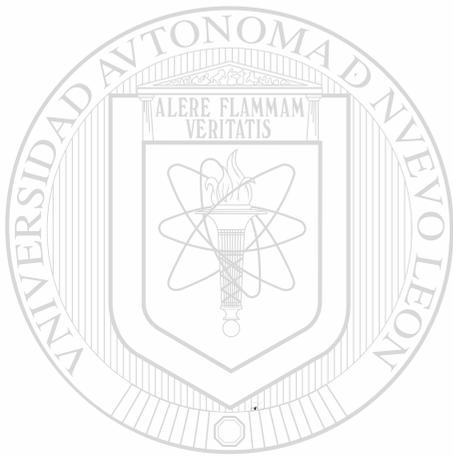
B 2

10.0 %

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

*EVALUADOS A PARTIR DE UNA SOLA MUESTRA.

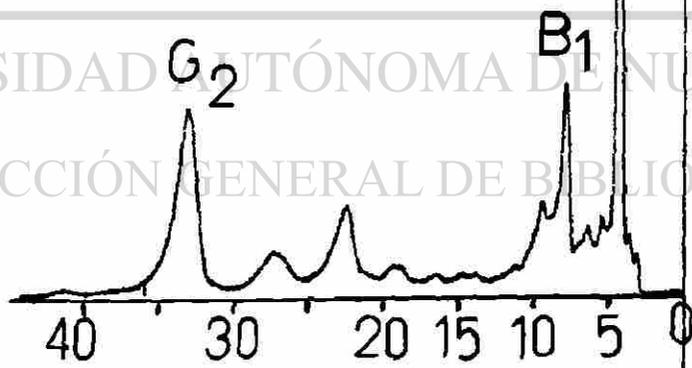
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



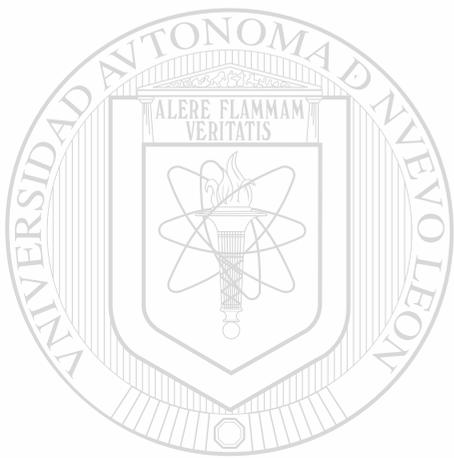
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



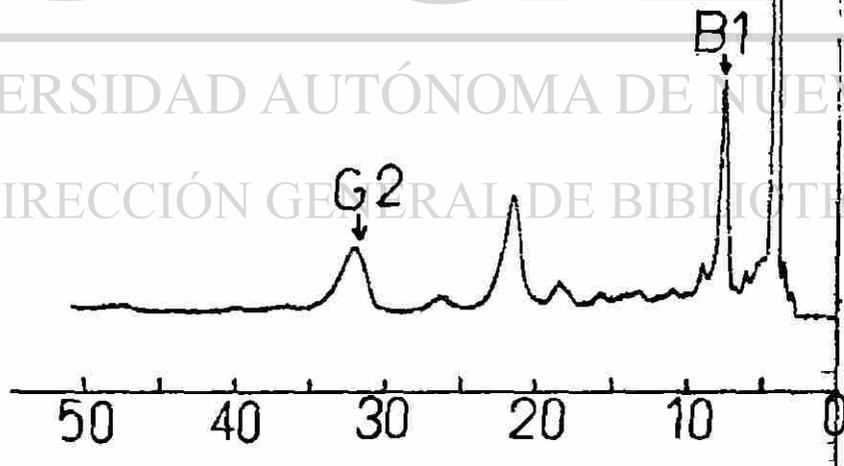
MUESTRA: MAIZ ENRIQUECIDO CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
TOTALES.
METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MUESTRA: CONTROL DE MAIZ HECHO POR EL METODO
DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2×5 MV

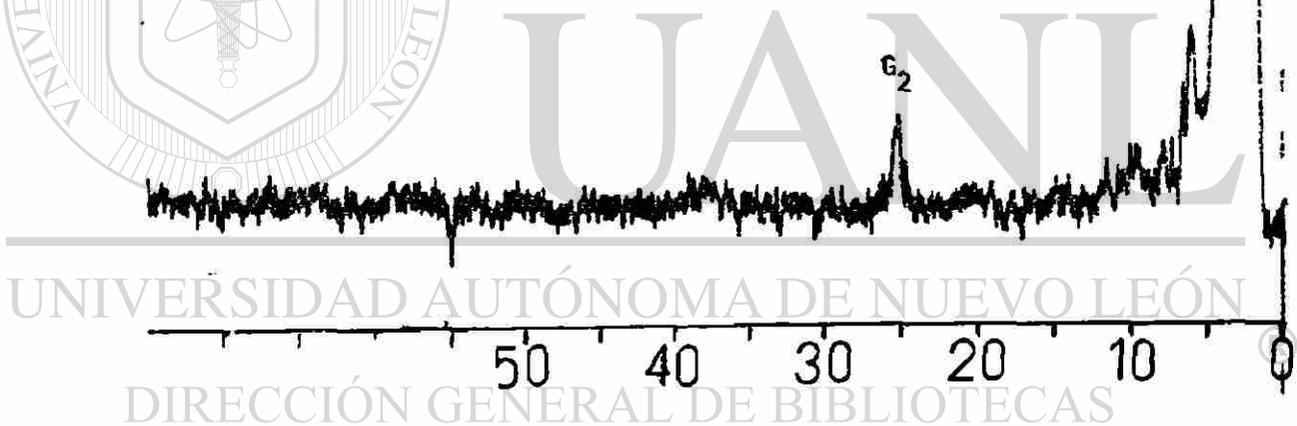
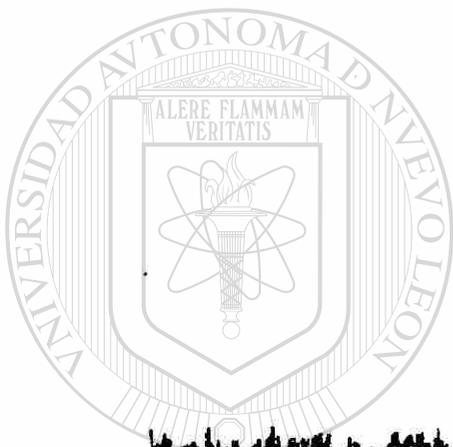
FIG. 7

Sin embargo no se especifica la cantidad de la fase s6lida que contienen las columnas ni la relaci6n de fase s6lida versus cantidad de muestra. Tampoco se especifican las condiciones 6ptimas para la preparaci6n de las muestras a fin de prolongar la vida media de las columnas. Se hicieron varios ensayos cambiando la cantidad de fase C-18 y se encontr6 que el uso de 600 mg fue superior en rendimiento a las dem6s cantidades ensayadas. Menores cantidades tales como 50, 100, 380 y 500 mg no lograron limpiar de grasas a las muestras lo suficiente, asi como tambi6n se registraron p6rdidas de las toxinas. El uso de cantidades superiores a 600 mg conduciria a usar mayores cantidades de solventes.

Para el procedimiento de extracci6n se probaron diferentes combinaciones de metanol-agua y, aunque algunas de ellas han sido reportadas (81,91), se probaron tres combinaciones que no se encontraron descritas a las condiciones de trabajo.

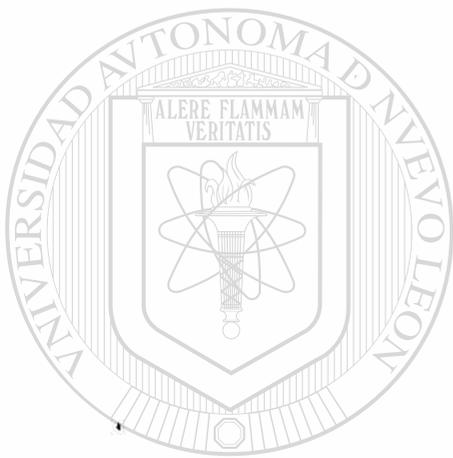
Las combinaciones de metanol-agua que se probaron fueron (70+30), (80+20) y (90+10). Usando la primer combinaci6n se extrajeron menores cantidades de aflatoxinas. Al usar la tercera combinaci6n se encontraron dificultades para llevar a cabo la percolaci6n a trav6s de la primer columna acondicionada, igualmente en el paso de filtraci6n a trav6s de membranas de poro de 0.45 micras. Probablemente ello fue debido a la mayor extracci6n de compuestos oleosos. La segunda combinaci6n produjo mayor uniformidad en el procedimiento de refinaci6n, lo cual se manifest6 en mejor reproducibilidad sobre los cromatogramas (Figs. 14-22).

Para el procedimiento de extracci6n en fase s6lida (SPE) se evaluaron las eluciones que se hicieron tanto en la primer columna como en la segunda. Al evaluar la primer columna se comprob6 que la mayoria de los compuestos grasos quedaron retenidos. Al hacer un seguimiento de las etapas de eluci6n de la segunda columna se encontraron dos pasos cr6ticos. El primero de ellos ocurre al pasar la diluci6n de 10 ml a trav6s de la columna previamente acondicionada. Este acondicionamiento permite la retenci6n de las aflatoxinas y de otros compuestos de polaridad ligeramente mayor. Un inadecuado acondicionamiento derivaria en la eluci6n de las toxinas y en la consecuente p6rdida de ellas. Los cromatogramas mostraron que en este paso en ocasiones se presenta una ligera p6rdida de la aflatoxina G 2 (Fig. 8). Para evitar tal p6rdida existen varias opciones: entre ellas, aumentar la cantidad de fase s6lida de la segunda columna o incrementar la polaridad de la diluci6n que se hace pasar a trav6s de ella; para cualquier alternativa se sugiere hacer un seguimiento por HPLC. Sin embargo, otros cromatogramas mostraron que en ocasiones se observa retenci6n de las toxinas (Fig. 9).



METODO DE EXTRACCION PARA MAIZ: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: EVALUACION DE LA SEGUNDA COLUMNA.
PRIMER PASO CRITICO EN LA ELUCION.
ESTE CROMATOGRAMA MUESTRA QUE EN OCASIONES HAY LIGERA
PERDIDA DE LA AFLATOXINA G 2.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV (MAXIMA).
DETECCION POR FLUORESCENCIA.

FIG. 8



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



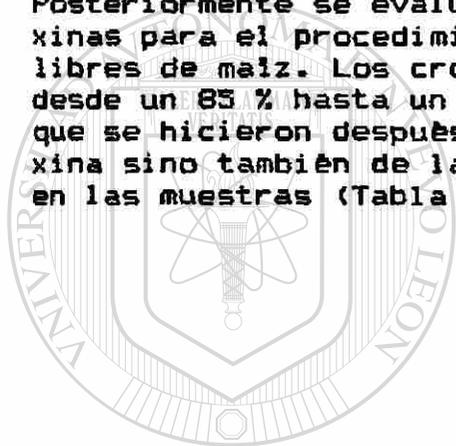
METODO DE EXTRACCION PARA MAIZ: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: EVALUACION DE LA SEGUNDA COLUMNA.
PRIMER PASO CRITICO EN LA ELUCION
ESTE CROMATOGRAMA MUESTRA QUE EN ESTE PASO DE ELUCION
NO HAY PERDIDA DE LA AFLATOXINA B 2.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV (MAXIMA).

FIG. 9

El segundo paso crítico se presenta en la adición de 6 ml de agua a través de la columna. En este paso se podría presentar una indeseable elución de las toxinas porque la finalidad de esta etapa es la de eluir compuestos de polaridad ligeramente mayor; sin embargo, los cromatogramas no mostraron pérdida de alguna de ellas (Fig. 10).

Al término del procedimiento SPE se hizo una evaluación para probar que la totalidad de las toxinas hubieran sido eluidas. Se repitió la percolación exclusivamente a base de solventes, pero los cromatogramas no mostraron pérdidas (Fig. 11).

Posteriormente se evaluó la extracción y purificación de las aflatoxinas para el procedimiento SPE mediante el tratamiento de muestras libres de maíz. Los cromatogramas mostraron recuperaciones que van desde un 85 % hasta un 92 % (Figs. 12 y 13). Las recuperaciones que se hicieron después, mostraron que no sólo dependen de cada toxina sino también de la cantidad con la que se encuentran presentes en las muestras (Tabla II).

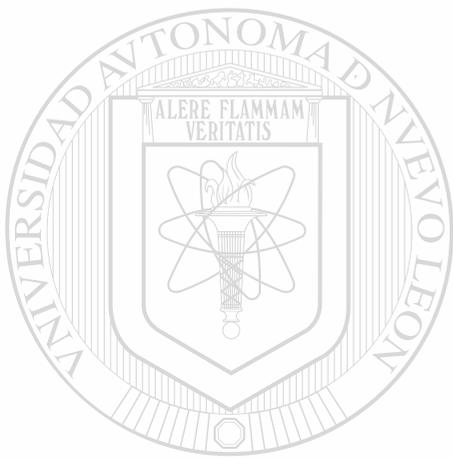


UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

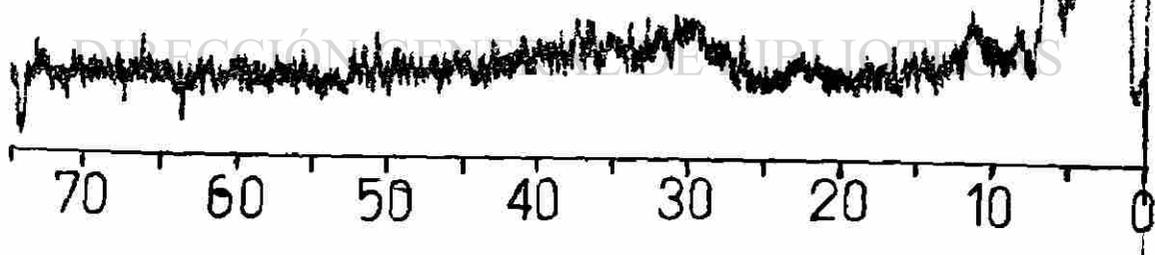


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



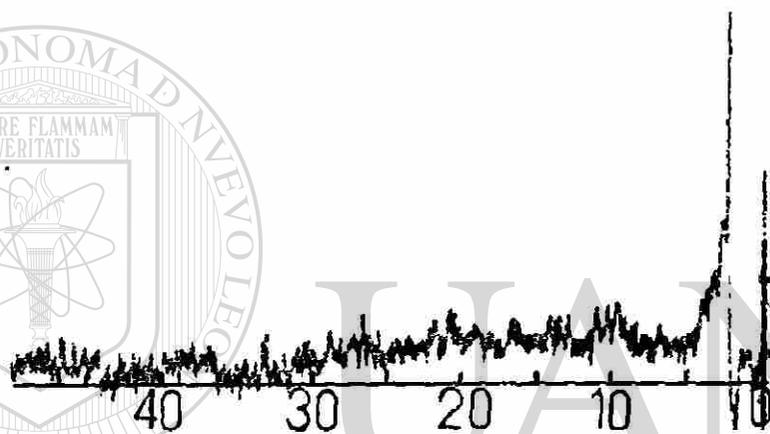
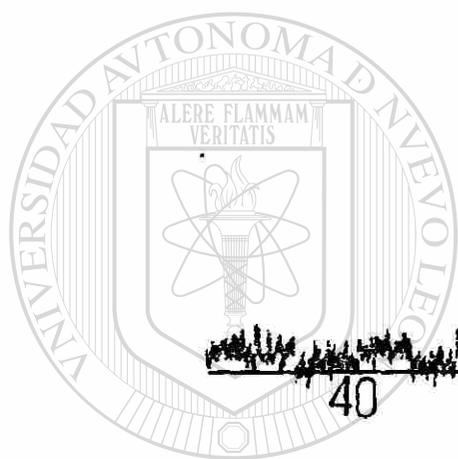
UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



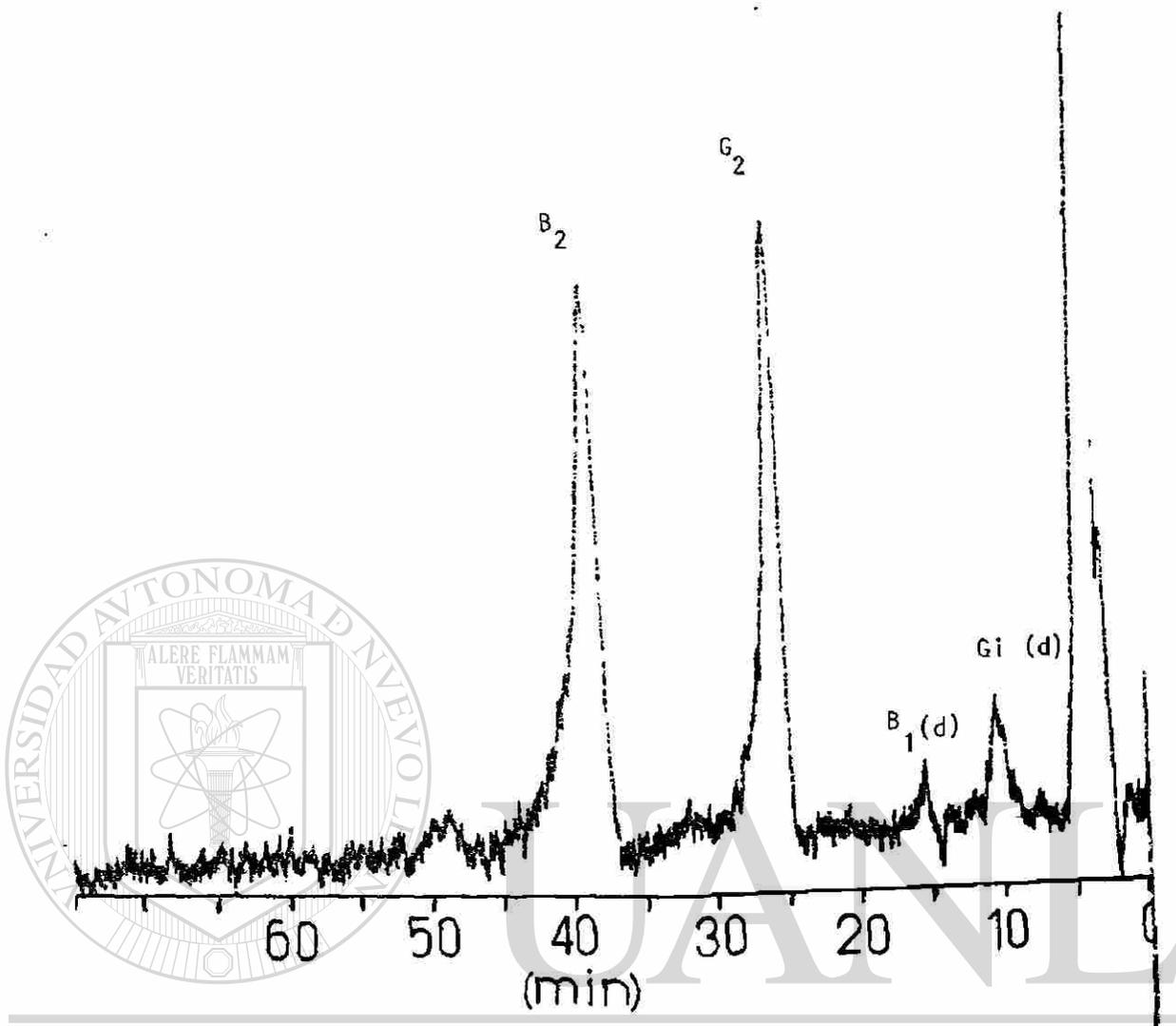
METODO DE EXTRACCION PARA MAIZ: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: EVALUACION DE LA SEGUNDA COLUMNA
SEGUNDO PASO CRITICO EN LA ELUCION.
SE OBSERVA RETENCION TOTAL DE AFLATOXINAS.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV (MAXIMA).

FIG. 10



METODO DE EXTRACCION: DOS COLUMNAS.
MUESTRA: ESTE CROMATOGRAMA DEMUESTRA QUE DESPUES DE
REALIZAR EL PROCEDIMIENTO DE LIMPIEZA MEDIANTE EL USO
DE LA FASE SOLIDA NO QUEDAN RESIDUOS DE AFLATOXINAS EN
ELLA CAPACES DE SER DETECTADOS.
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV.

FIG. 11



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MUESTRA: BLANCO PARA EVALUAR LA EXTRACCIÓN DE AFLATOXINAS SIN EMPLEAR MAIZ.

CONCENTRACION: SE SUPUSO UNA CONTAMINACION EQUIVALENTE A:

G 1: 7 NG/G	G 2: 80 NG/G
B 1: 4 NG/G	B 2: 60 NG/G

METODO DE EXTRACCIÓN: DOS COLUMNAS.

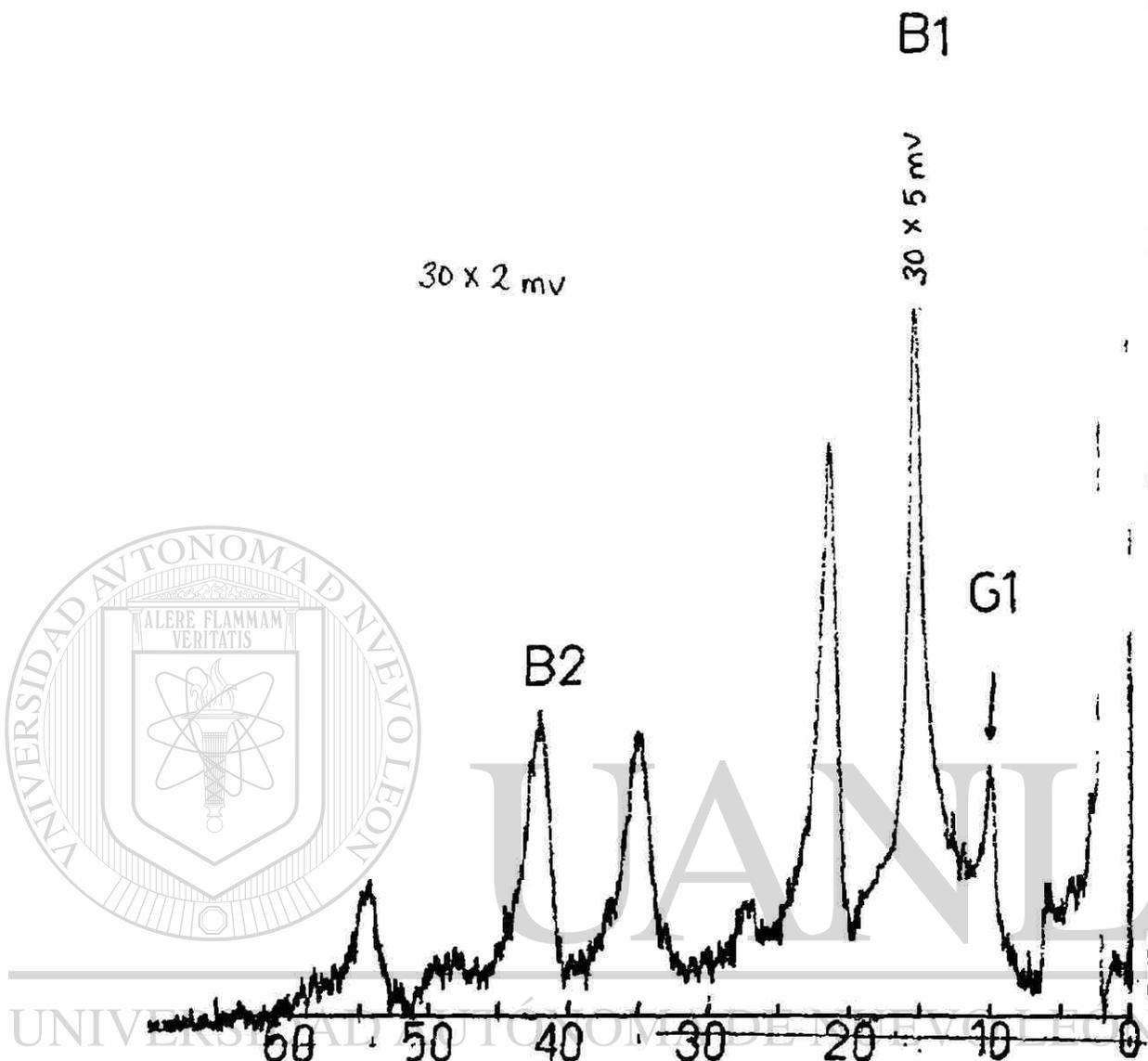
VOLUMEN DE RECUPERACION: 2 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

SENSIBILIDAD: 30 x 2 MV.

RECUPERACION:	G 1: 89 %	G 2: 87 %
	B 1: 86 %	B 2: 92 %

FIG. 12



MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
USADO COMO CONTROL.

OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION
NATURAL DE:

G 1: 4 NG/G

G 2: MENOS DE 1 NG/G.

B 1: 40 NG/G

B 2: 15 NG/G.

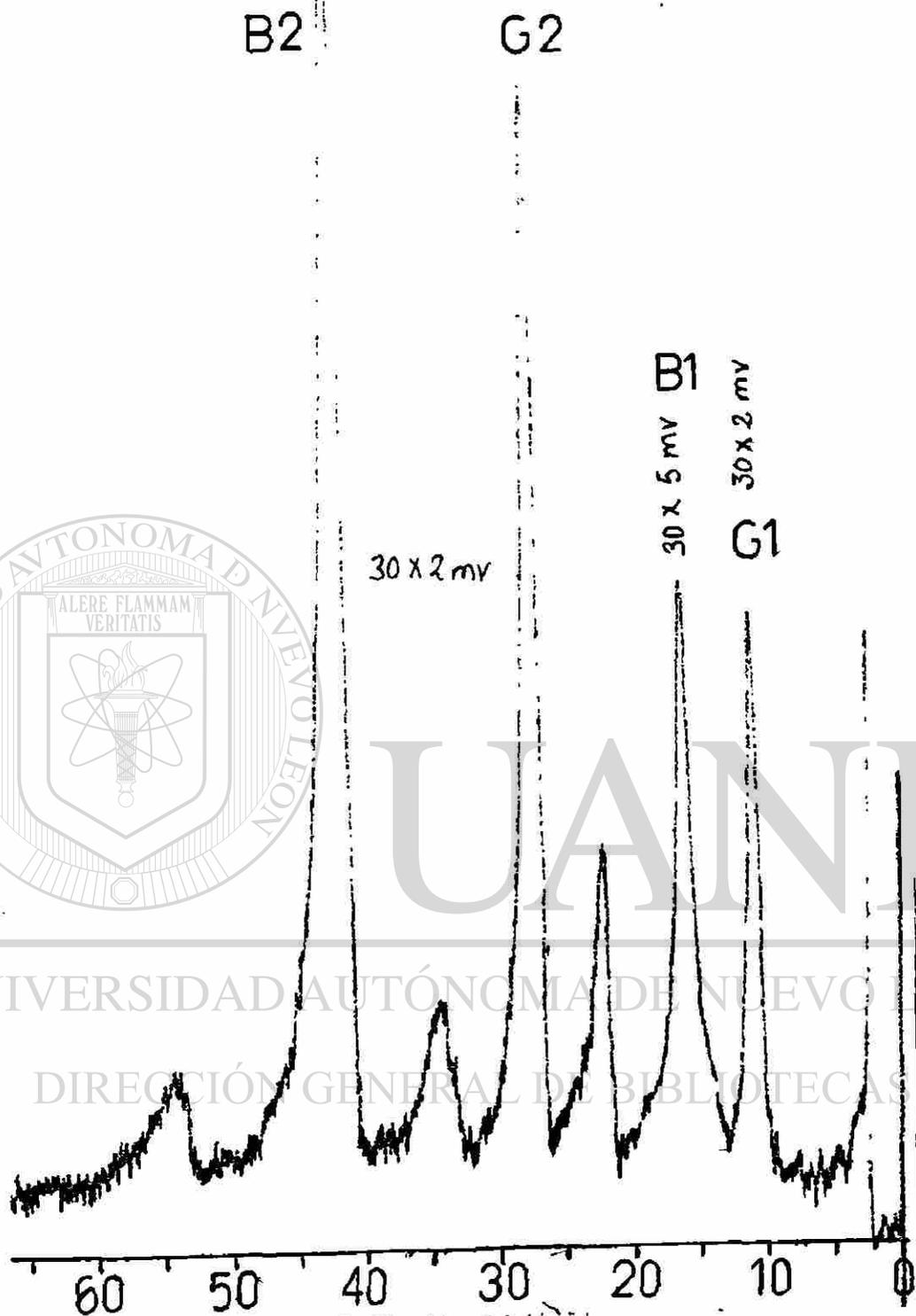
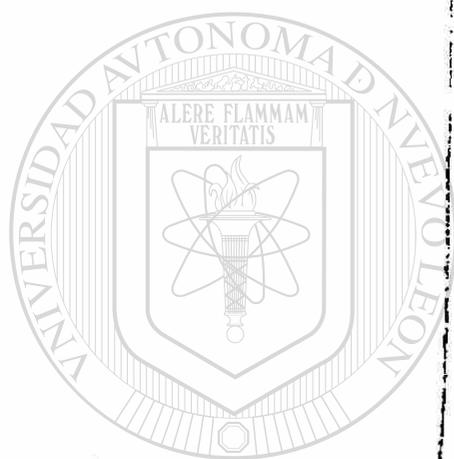
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA. METODO: DOS COLUMNAS.

SENSIBILIDAD: B 1 : 30 x 5 MV.

G 1, G 2, B 2: 30 x 2 MV.

FIG. 14



MUESTRA: MAIZ ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:

G 1: 12 NG/G

G 2: 75 NG/G

B 1: 2.5 NG/G

B 2: 60 NG/G

DETECCION POR FLUORESCENCIA. METODO: DOS COLUMNAS.

VOL. DE RECUPERACION: 1 ML.

SENSIBILIDAD: B 1: 30 x 5 MV. G1, G2, B2: 30 x 2 MV.

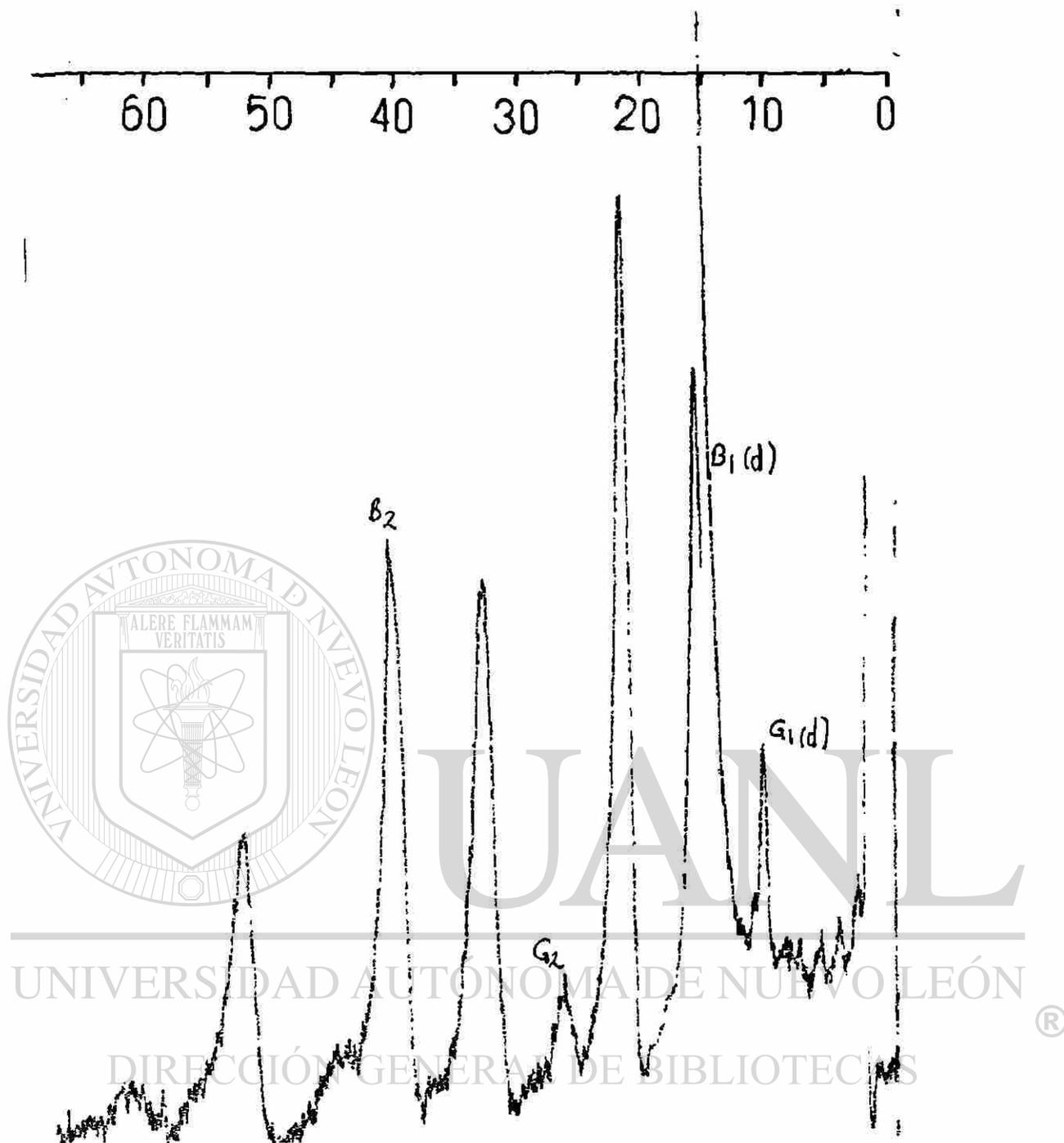
RECUPERACION: G 1: 88 %

G 2: 87 %

B 1: 85 %

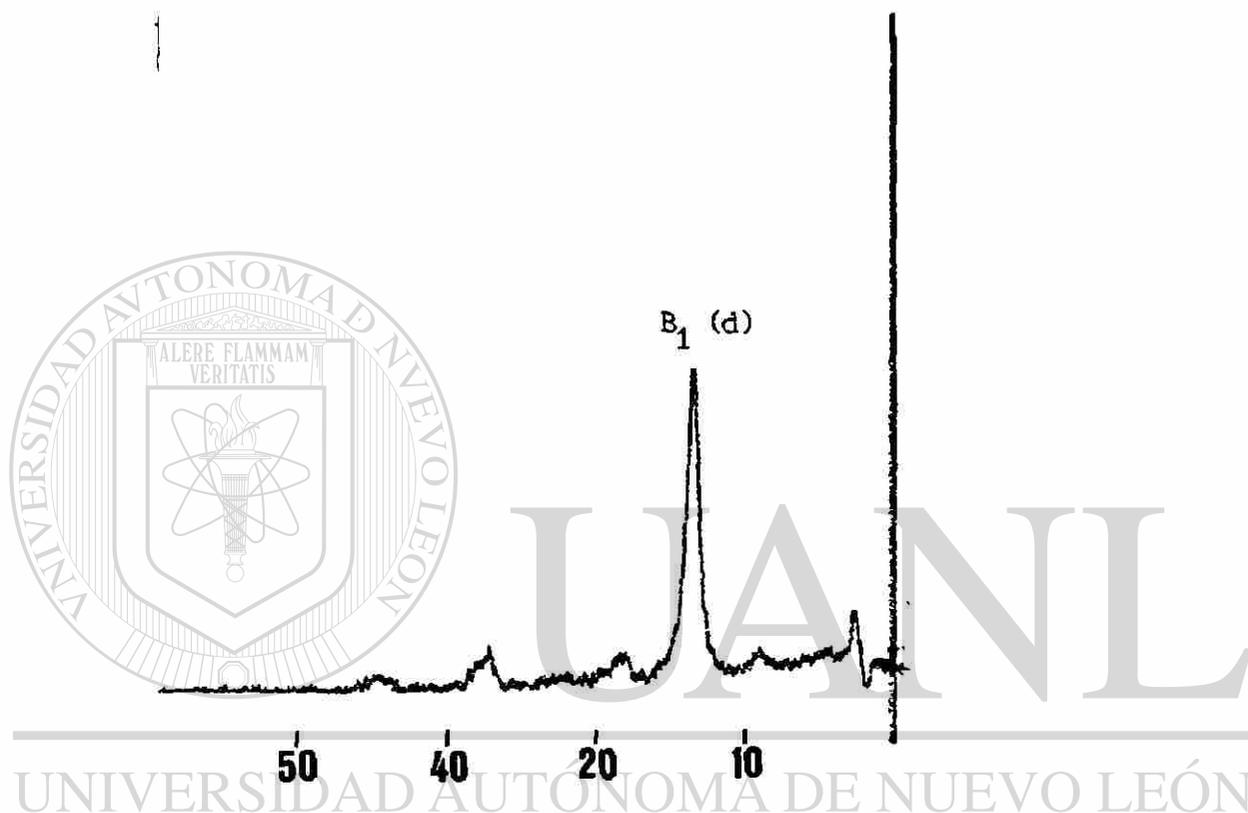
B 2: 94 %

FIG. 15



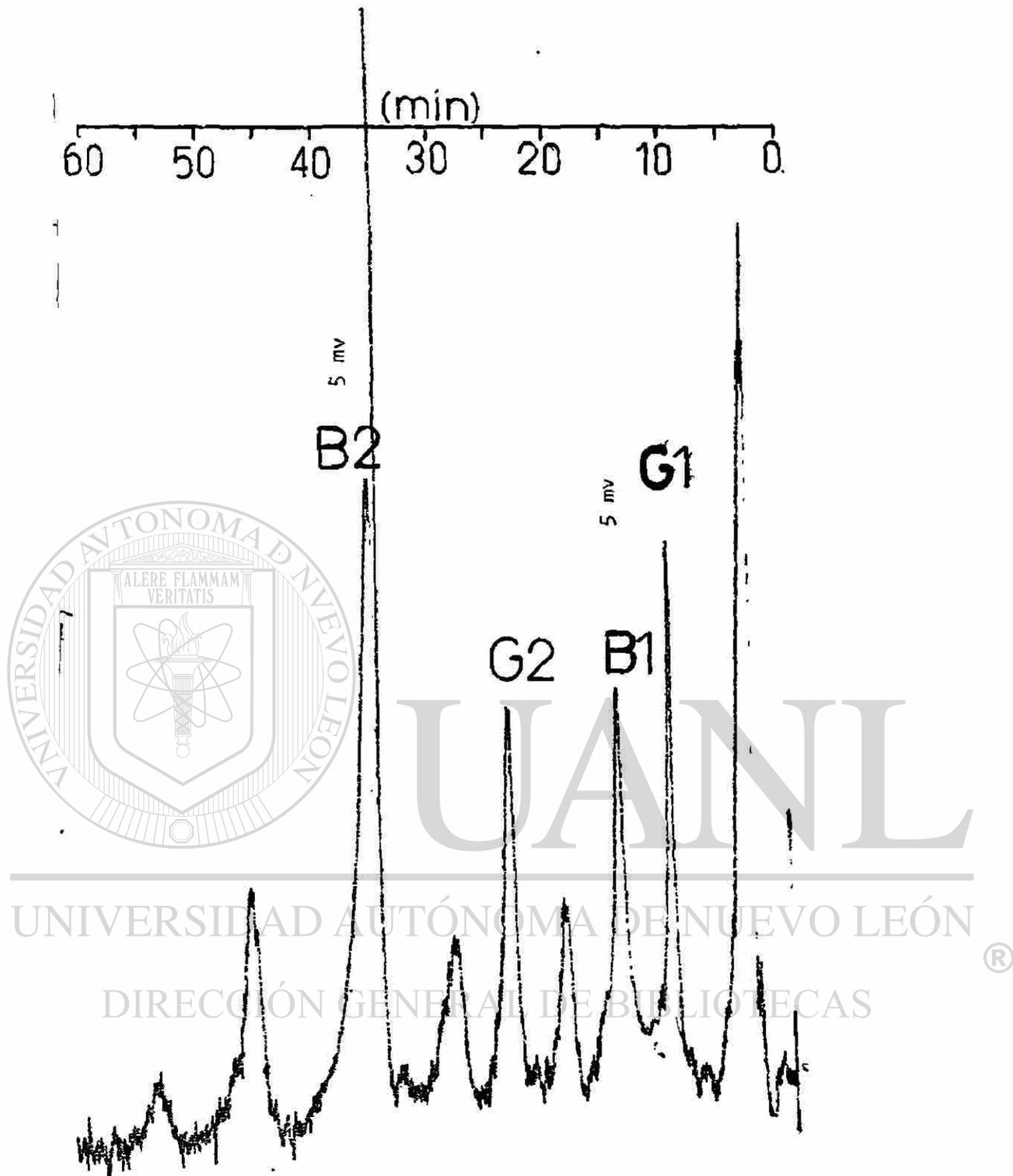
MUESTRA: MAIZ AMARILLO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
 G 1: 21 NG/G G 2: 22 NG/G
 B 1: 138 NG/G B 2: 100 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
 DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA. METODO: DOS COLUMNAS.
 SENSIBILIDAD: G 1, G 2, B 2: 30 x 2 MV.
 B 1: 30 x 5 MV.

FIG. 17



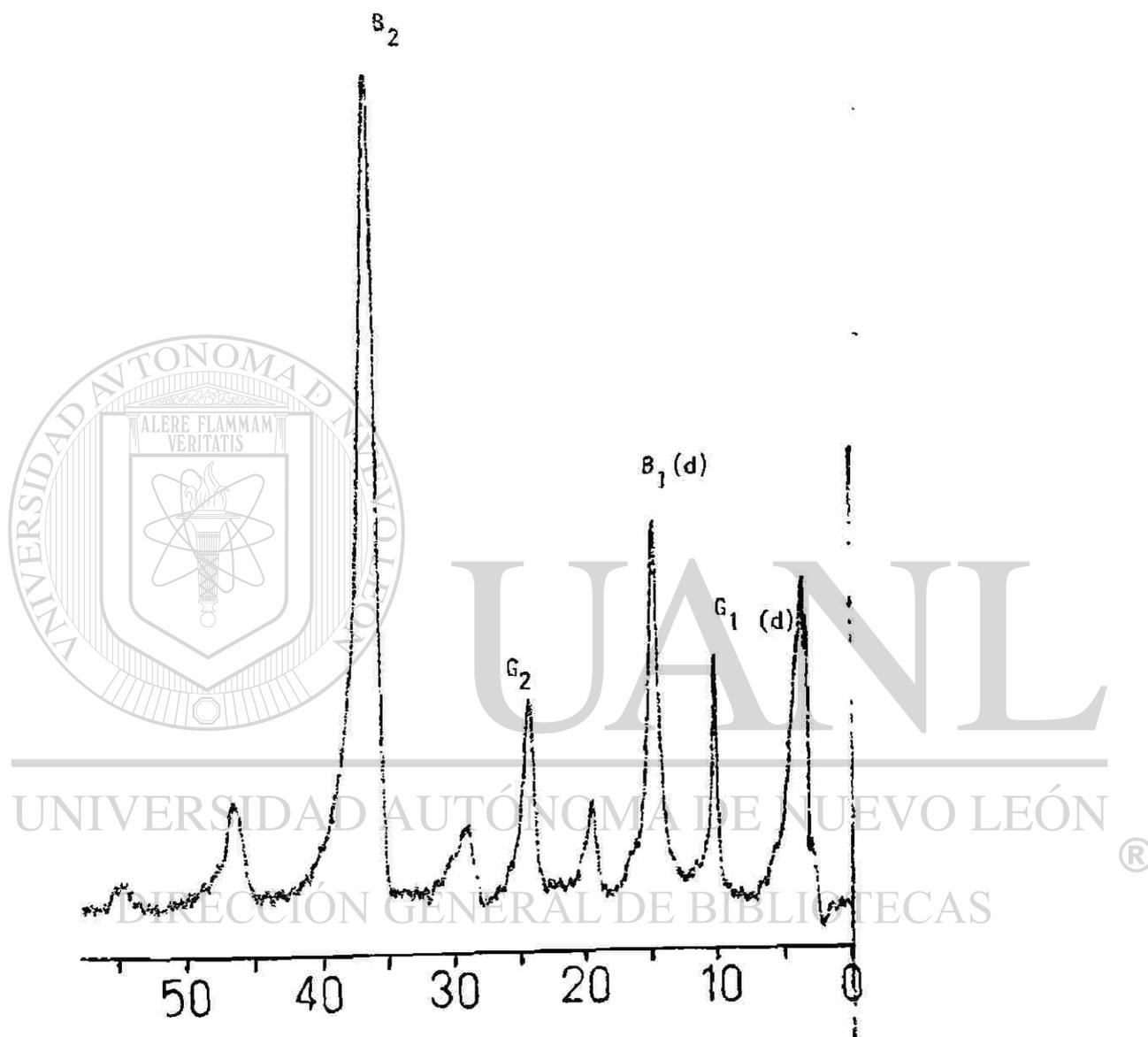
MUESTRA: MAIZ BLANCO CONTAMINADO EN FORMA NATURAL
 CON 72 NG/G DE B 1. MUESTRA USADA COMO CONTROL.
 METODO DE EXTRACCION: DOS COLUMNAS.
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 4 ML.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 30×5 MV.

FIG. 19



MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS
 G 1: 60 NG/G G 2: 120 NG/G.
 B 1: 42 NG/G B 2: 450 NG/G
 OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION
 NATURAL DE 72 NG/G DE B 1. METODO: DOS COLUMNAS.
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 4 ML. DETECCION: FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: G 1, G 2: 30 x 2 MV; B 1, B 2: 30 x 5 MV.
 RECUPERACION: G1: 96 %, B1: 85 %, G 2: 88 %, B 2: 92 %

FIG. 21



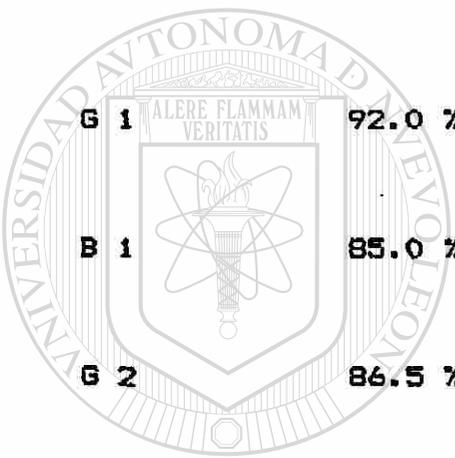
MUESTRA: MAIZ BLANCO ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS
 G 1: 60 NG/G G 2: 130 NG/G
 B 1: 35 NG/G B 2: 500 NG/G
 OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA UNA CONTAMINACION
 NATURAL DE 72 NG/G PARA B 1.
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 4 ML. METODO: DOS COLUMNAS
 SENSIBILIDAD: 30 x 5 MV. DETECCION: FLUORESCENCIA
 RECUPERACION: G 1: 93%, B 1: 84%, G 2: 86%, B 2: 96%

FIG. 22

TABLA II.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DEL METODO DE DOS COLUMNAS USADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MAIZ.

AFLATOXINA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	LIMITES DE CONFIABILIDAD* AL 95 %
------------	-------	---------------------	-----------------------------------



G 1	92.0 %	3.36 %	92 + 5.34 %
B 1	85.0 %	0.13 %	85.1 + 0.21 %
G 2	86.5 %	1.29 %	86.5 + 2.05 %
B 2	93.5 %	1.91 %	93.5 + 3.03 %

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

* EVALUACION A PARTIR DE CUATRO MUESTRAS.

CACAHUATE.

Aunque la selección del tamaño de la muestra de análisis no formó parte de los objetivos de la presente investigación, se hizo una revisión de la literatura al respecto, y se encontró que ciertos estudios estadísticos demostraron que la mayor variabilidad en la determinación de aflatoxinas en muestras de cacahuete ocurre en la selección del tamaño de la muestra de laboratorio sobre la cual se realiza el análisis (93). Otros estudios demostraron que el uso de muestras de laboratorio de 280 g producen un coeficiente de variación total de 118 % y que éste disminuye a medida que se incrementa el tamaño de la muestra de análisis (94). Sin embargo, la medida de la muestra se determina en función de los recursos disponibles y del error que se pueda tolerar.

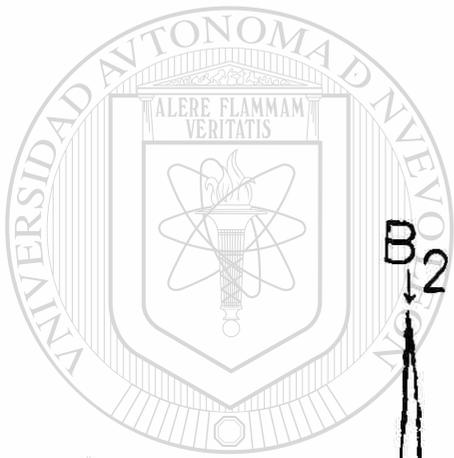
Aunque se usaron muestras de laboratorio de 10 g para la elaboración de los análisis, la combinación de metanol-agua y la relación solvente/cacahuete que se usaron fueron las mismas que se han reportado como óptimas (86,87). El cloroformo se usó como ha sido recomendado por el procedimiento BF (81). Los cromatogramas obtenidos mostraron reproducibilidad (Figs. 23-29).

Los porcentajes de recuperación variaron desde un 84.2 % hasta un 87.5 % y también mostraron que no sólo dependen del tipo de toxina sino de la cantidad presente en las muestras (Tabla III).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

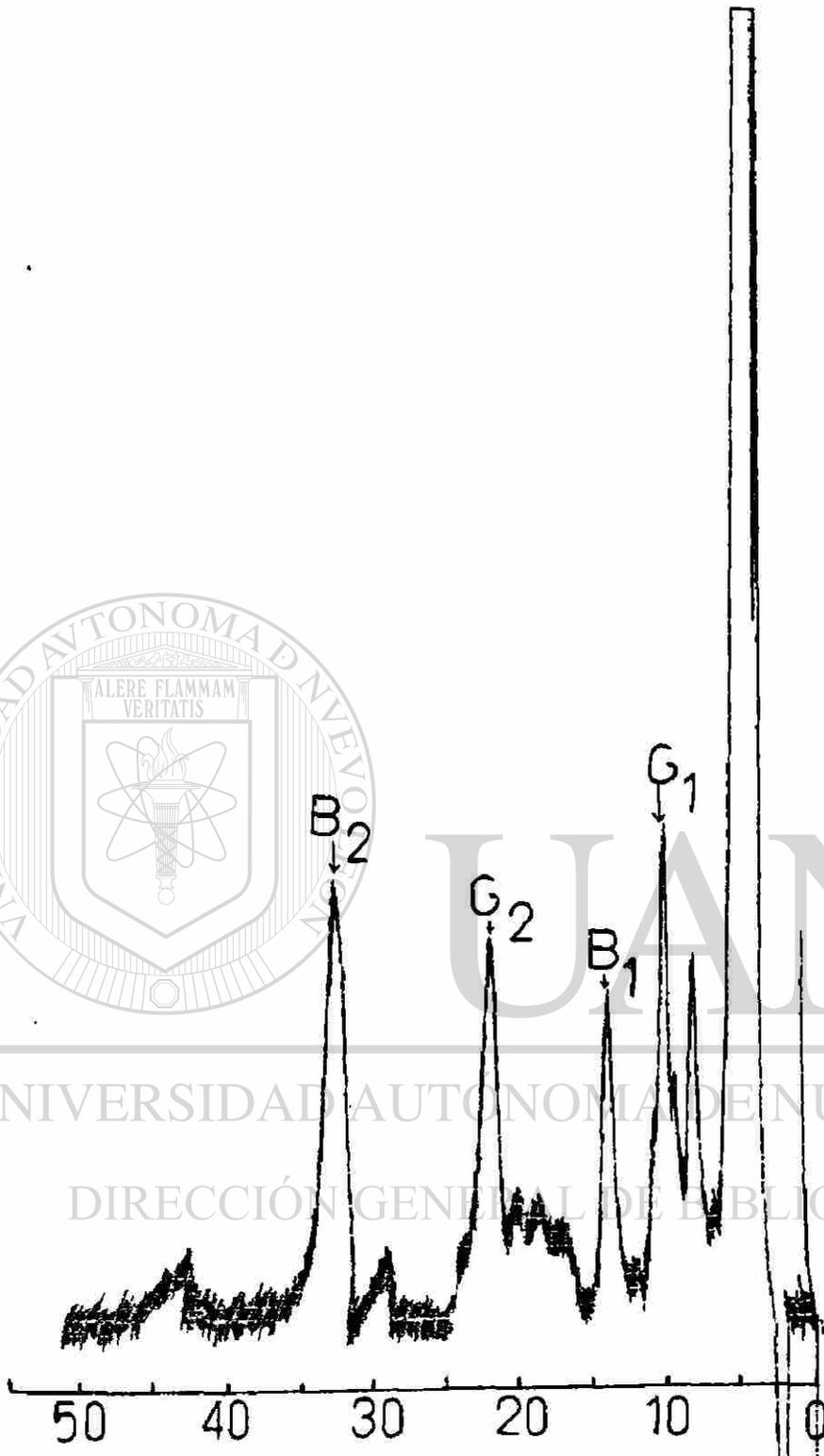




U A N L

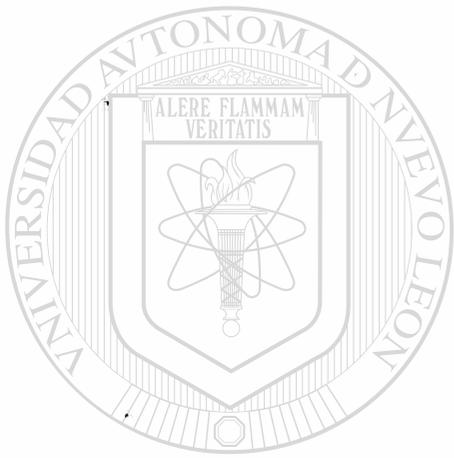
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MUESTRA: CONTROL DE CACAHUATE.
OBSERVACION: LA MUESTRA PRESENTA CONTAMINACION NATURAL
G 1: 1.3 NG/G G 2: 1 NG/G.
B 1: 0.5 NG/G B 2: 0.8 NG/G
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.05 x 2 MV.

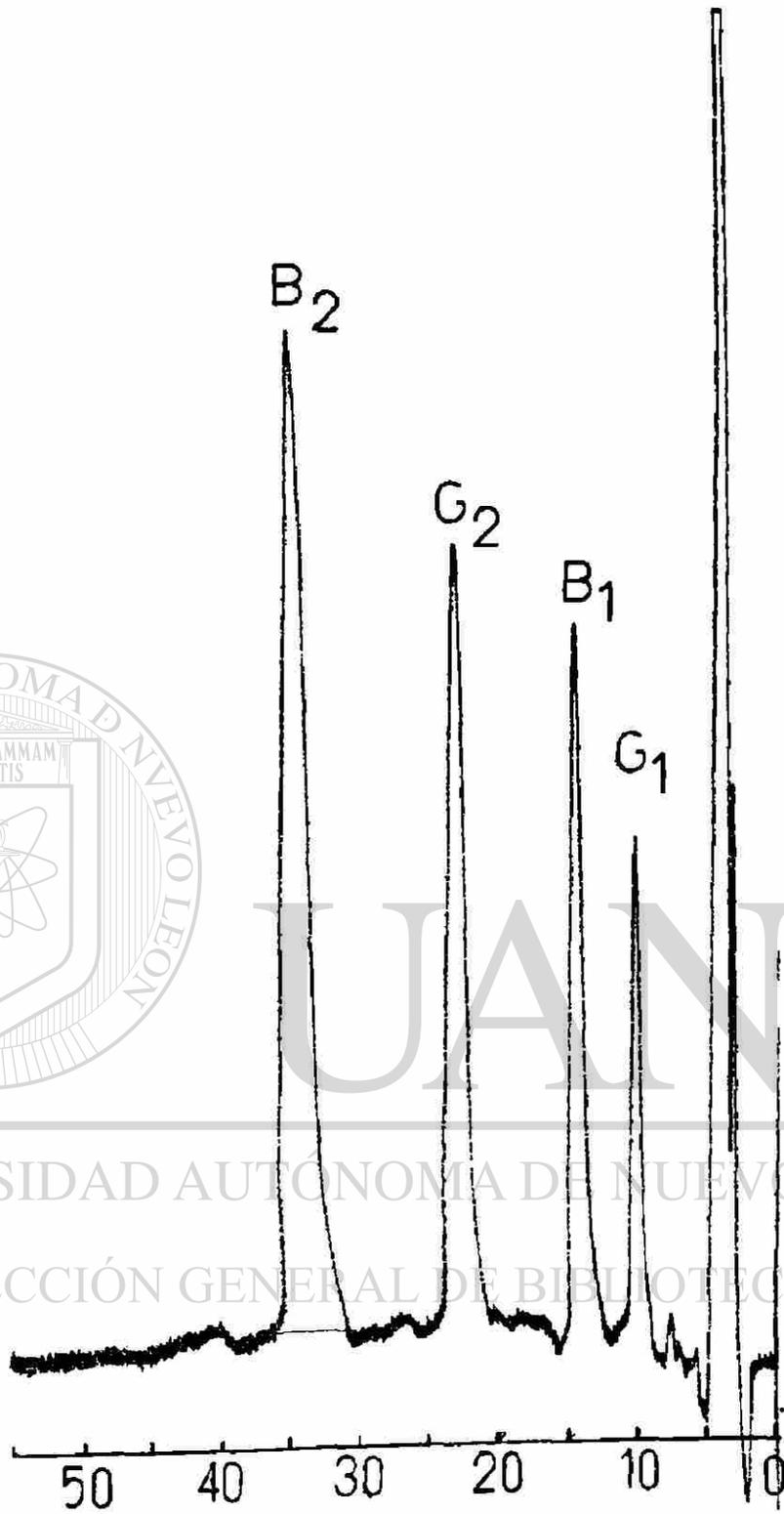
FIG. 23



UANL

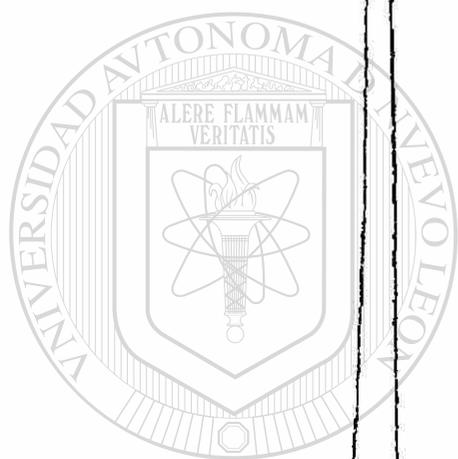
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
G 1: 15 NG/G
B 1: 10 NG/G
VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.05 x 5 MV.
RECUPERACION: G 1: 85 %
B 1: 88 %
G 2: 20 NG/G
B 2: 15 NG/G
G 2: 90 %
B 2: 83 %

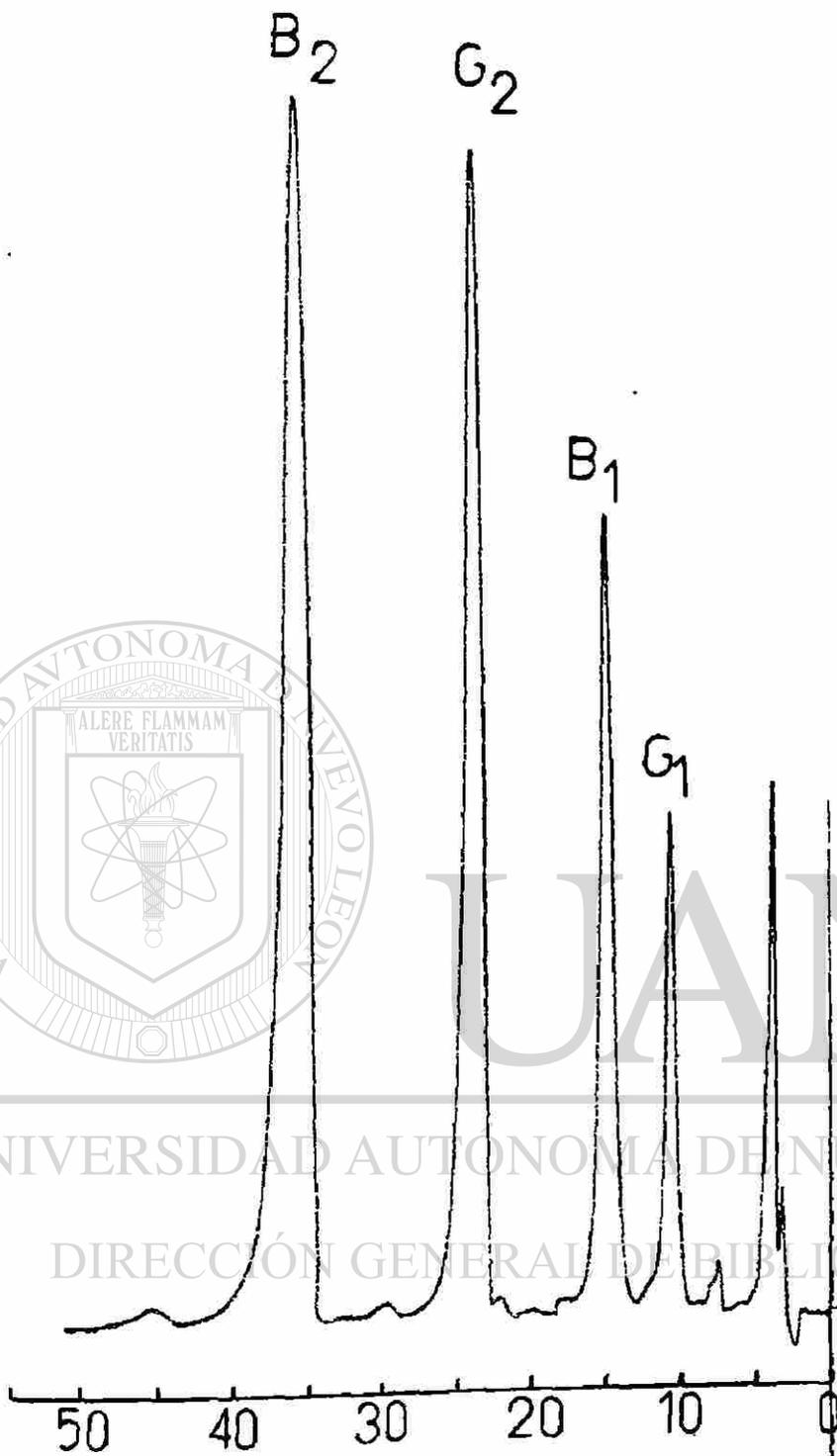
FIG. 24



UNANL

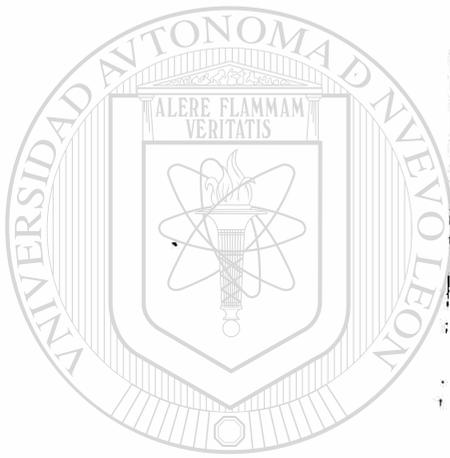
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
G 1: 60 NG/G G 2: 120 NG/G
B 1: 50 NG/G B 2: 70 NG/G
VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV
RECUPERACION: G 1: 89 % G 2: 92 %
 B 1: 80 % B 2: 90 %

FIG. 25



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:

B 1 : 150 NG/G G 2: 250 NG/G B 2: 210 NG/G

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

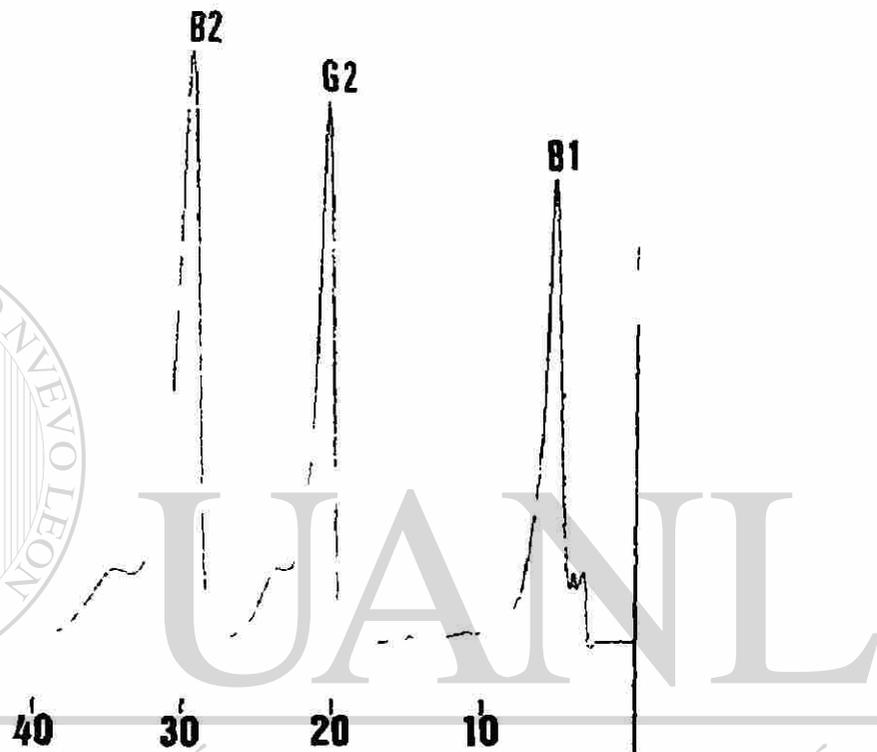
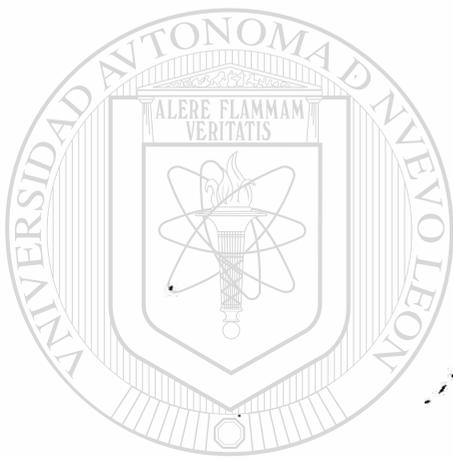
SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 84 % G 2: 86 % B 2: 96 %

FIG. 26



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS

B 1: 110 NG/G G 2 : 172 ng/g B 2: 150 ng/g

VOLUMEN DE RECUPERACION : 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

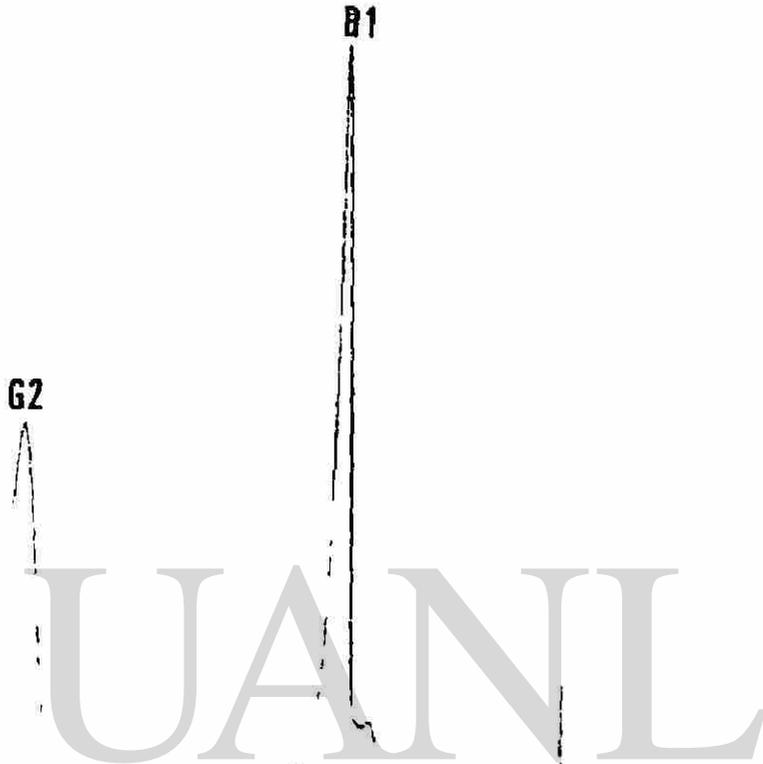
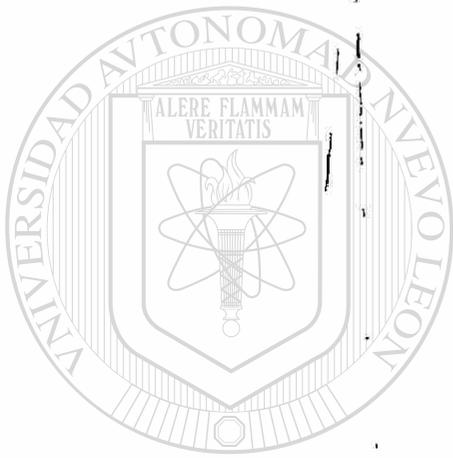
SENSIBILIDAD: 0.2 x 10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1 : 89 % G 2: 87 % B 2: 92 %

FIG. 27



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

50 40 30 20 10

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:

B 1: 32 NG/G G 2: 24 NG/G B 2: 20 NG/G

VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

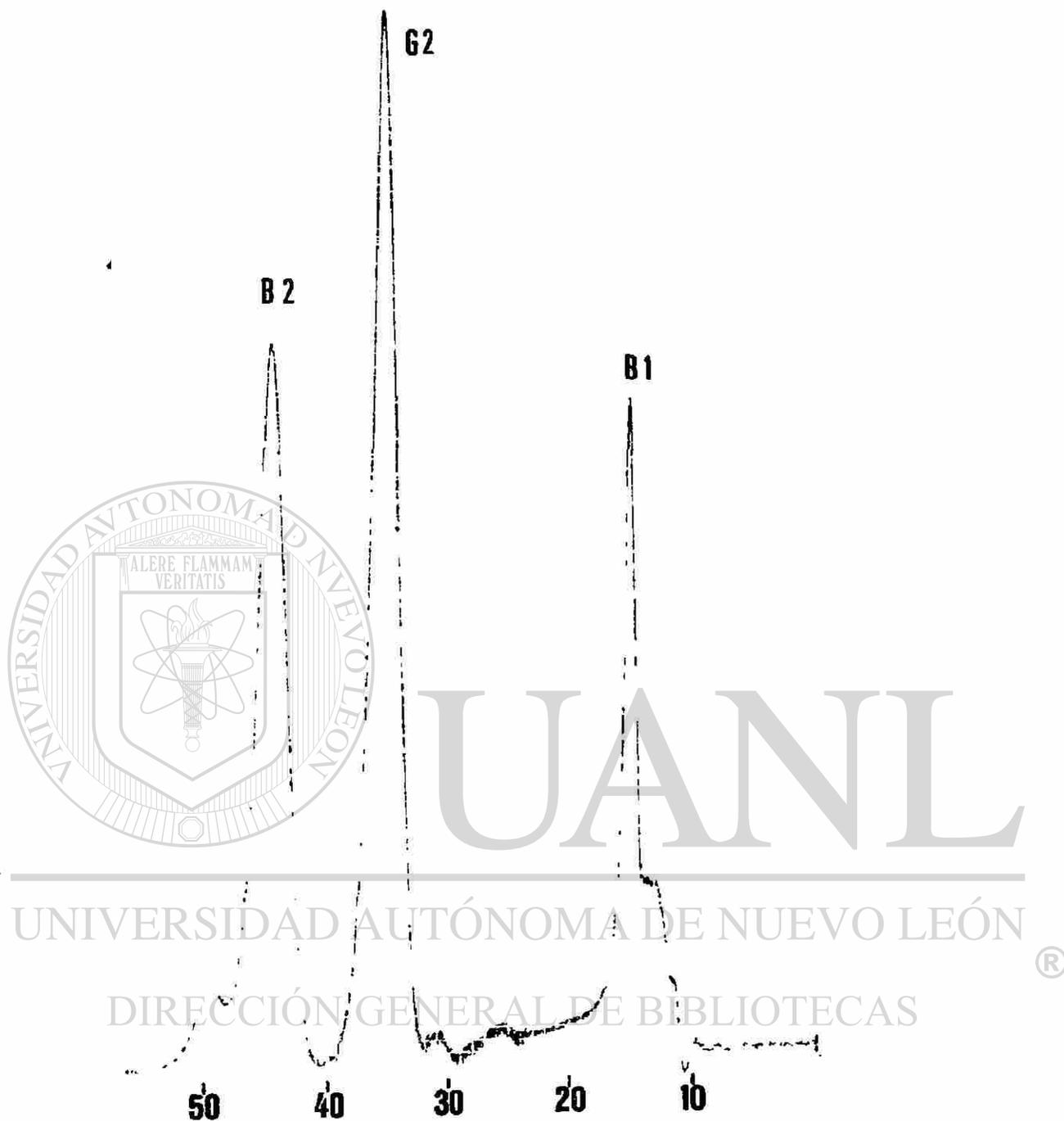
SENSIBILIDAD: 0.05 x 20 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (6) + 40)

RECUPERACION: B 1: 23 % G 2: 78 % B 2: 82 %

FIG. 28



MUESTRA: CACAHUATE ENRIQUECIDO CON AFLATOXINAS:
 B 1: 15 NG/G G 2: 19 NG/G B 2: 15 NG/G
 VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.
 DETECCIÓN POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: B 1, B 2: 0.05 x 10 MV; G 2: 0.05 x 5 MV
 FLUJO: 1.5 ML/MIN
 FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 +40)
 RECUPERACION: B 1: 81 % G 2: 82 % B 2: 85 %

FIG. 29

TABLA III.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE MUESTRAS DE CACAHUATE.

AFLATOXINA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	LIMITES DE CONFIABILIDAD* AL 95 %
------------	-------	---------------------	-----------------------------------

G 1	86.5 %	3.53 %	86.5 + 7.94 %
-----	--------	--------	---------------

B 1	84.2 %	3.65 %	84.2 + 5.80 %
-----	--------	--------	---------------

G 2	85.5 %	5.57 %	85.5 + 7.24 %
-----	--------	--------	---------------

B 2	87.5 %	6.37 %	87.5 + 8.28 %
-----	--------	--------	---------------

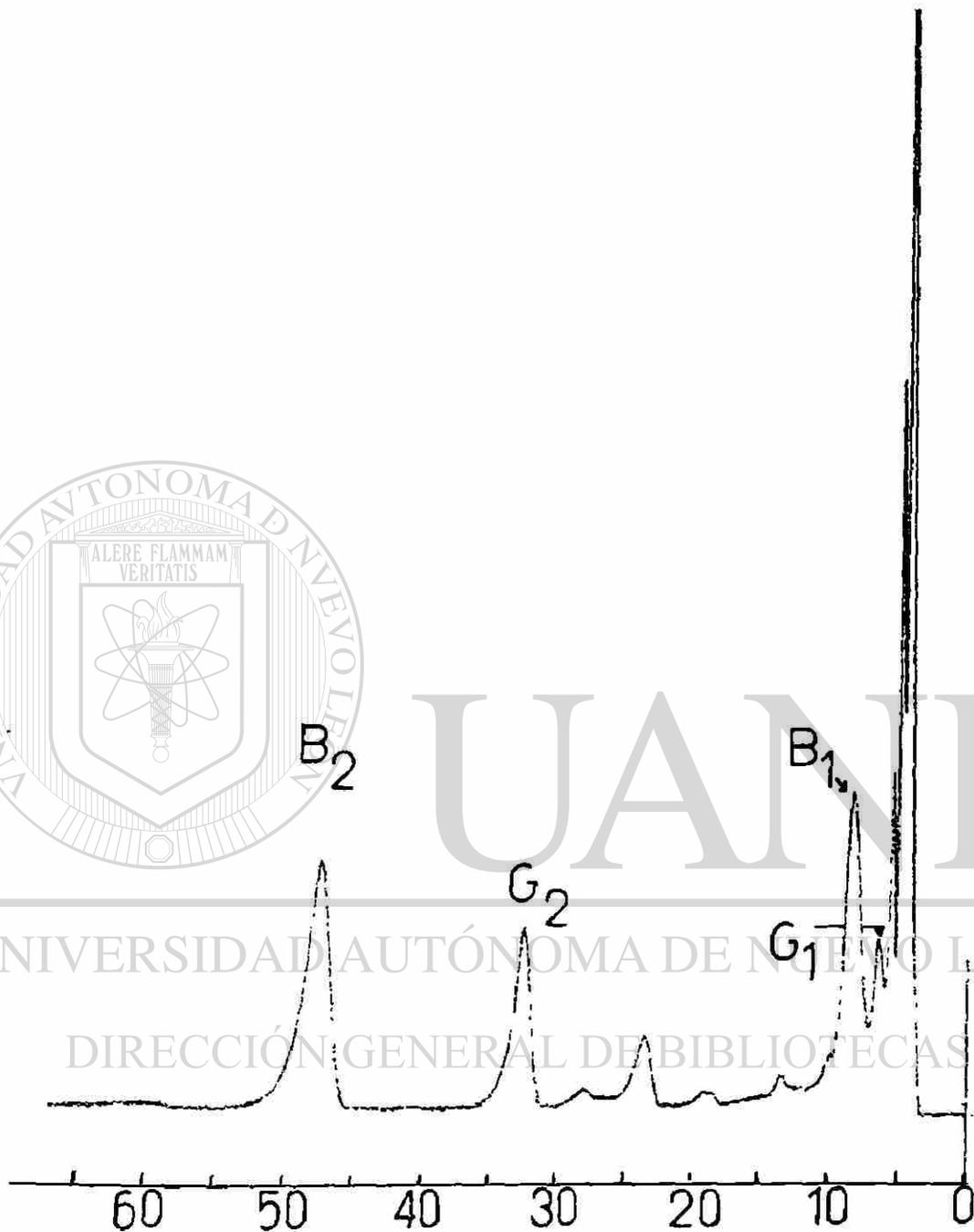
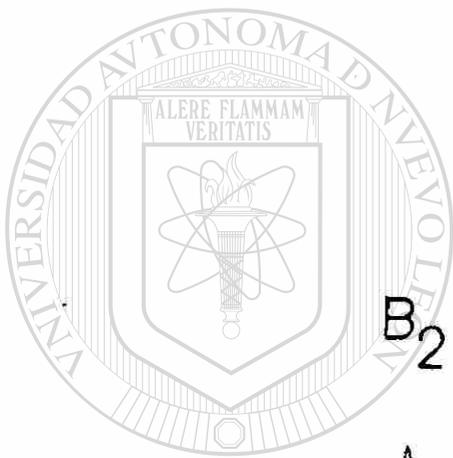
*EVALUACION A PARTIR DE SEIS MUESTRAS.

NUEZ.

Para el caso de la nuez, la elección del tamaño de la muestra de laboratorio tampoco constituyó parte de los objetivos. De hecho, la literatura que se encontró sobre análisis de aflatoxinas fue escasa; sin embargo algunos estudios han demostrado alta variabilidad en la determinación de las toxinas, la cual depende en mayor parte de la cantidad que se usa como muestra de laboratorio (94, 95). A pesar de ello, la cantidad que se usó para la realización del presente estudio fue de 10 g.

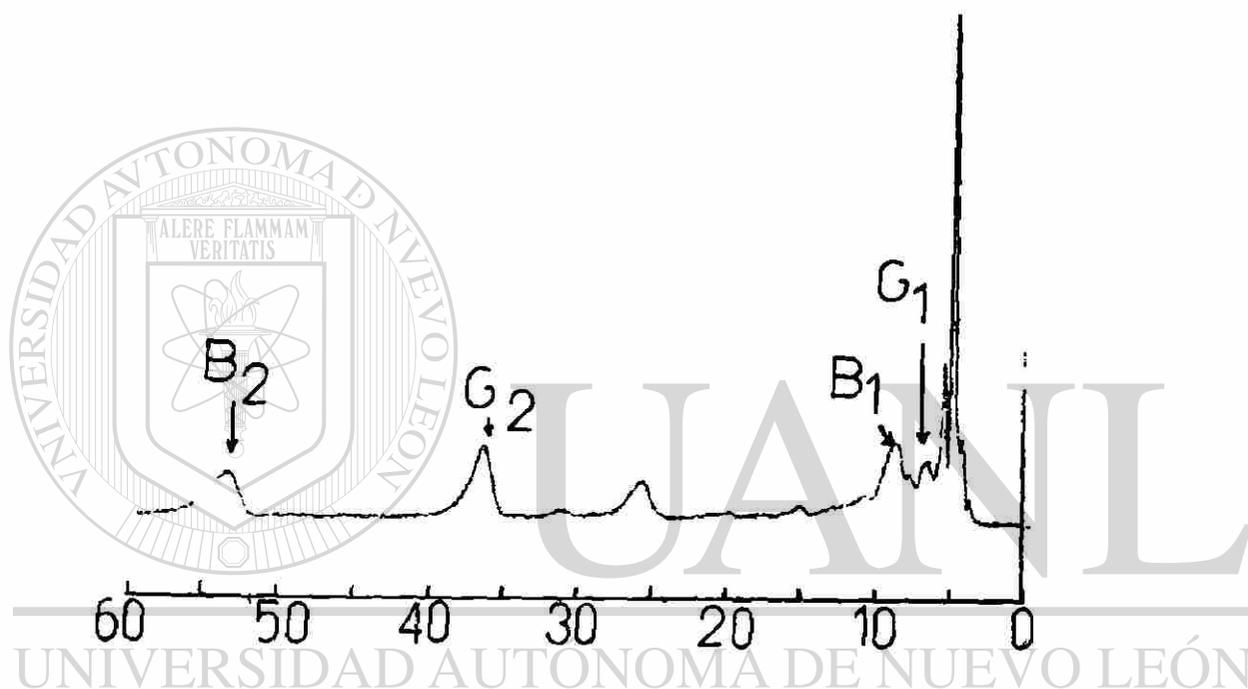
Dada su naturaleza, se consideró aplicar a la nuez el mismo procedimiento de extracción que el del cacahuate, pero haciendo dos cambios: se incrementó el volumen de hexano un 50 % (de 20 a 30 ml) dado el mayor contenido de compuestos oleosos y se incrementó un 50 % la concentración del electrolito (de 0.5 % a 1 % en la mezcla MeOH + H₂O) con la finalidad de lograr menor disolución de grasas en la mezcla de extracción MeOH + H₂O. Los cromatogramas obtenidos mostraron que no solamente las aflatoxinas se extrajeron, sino también otros compuestos fluorescentes que no son de interés (Fig. 30). Estos compuestos aparecieron en dos grupos: uno de ellos apareció entre B 1 derivatizada y G 2 y el otro grupo cerca de G 1 derivatizada. Al tomar en cuenta que el procedimiento de derivatización se realizó después de la extracción y purificación de la muestra, se supuso que esos dos grupos de compuestos fluorescentes superarían en polaridad a las cuatro aflatoxinas, puesto que G 2 es la más polar de todas ellas. Así pues, se consideró que aumentando ligeramente la concentración de agua en la solución de extracción (de 41 % a 50 %), los compuestos que no eran de interés permanecerían en esa mezcla de mayor polaridad al momento de efectuarse la extracción de las aflatoxinas mediante la adición de cloroformo. Sin embargo no se obtuvieron esos resultados, ya que los dos grupos de compuestos fueron extraídos en la capa cloroformica junto con las aflatoxinas (Fig. 31).

La evidencia experimental de los dos procedimientos anteriores hizo suponer que la polaridad del cloroformo ejercía alta influencia para extraer los compuestos fluorescentes que no son de interés. Por ello mismo, se propuso disminuir la polaridad del solvente usado en la purificación; así, en lugar de emplear cloroformo, se utilizó una mezcla de cloroformo-tetracloruro de carbono (15+10), la cual es menos polar que el cloroformo solo. El volumen se mantuvo invariable en 25 ml. No obstante los cromatogramas mostraron la desaparición del grupo de compuestos más cercano a G 2, aquéllos



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
TOTALES.
METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO.
DETECCION POR FLUORESCENCIA.
SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 mv.
PORCENTAJES DE RECUPERACION NO CALCULADOS SOBRE LA MUESTRA.

FIG. 30



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
 TOTALES.
 METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO ADICIONANDO 20 ML
 MAS DE AGUA.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV.
 PORCENTAJES DE RECUPERACION NO CALCULADOS SOBRE LA MUESTRA.

FIG. 31

que estuvieron más cercanos a G 1 permanecieron aunque en menor cantidad (Fig. 32). Posteriores ensayos no mostraron extracción de compuestos diferentes a las aflatoxinas (Figs. 33-37).

Los porcentajes de recuperación variaron de un 88 % a un 91 % (Tabla IV). Aunque no se observó una diferencia muy marcada entre el tipo de aflatoxina y la recuperación de cada una de ellas, sí se pudo notar que la recuperación depende de la cantidad presente en las muestras (Figs. 33-37).

Discusión de los métodos fisicoquímicos de detección.

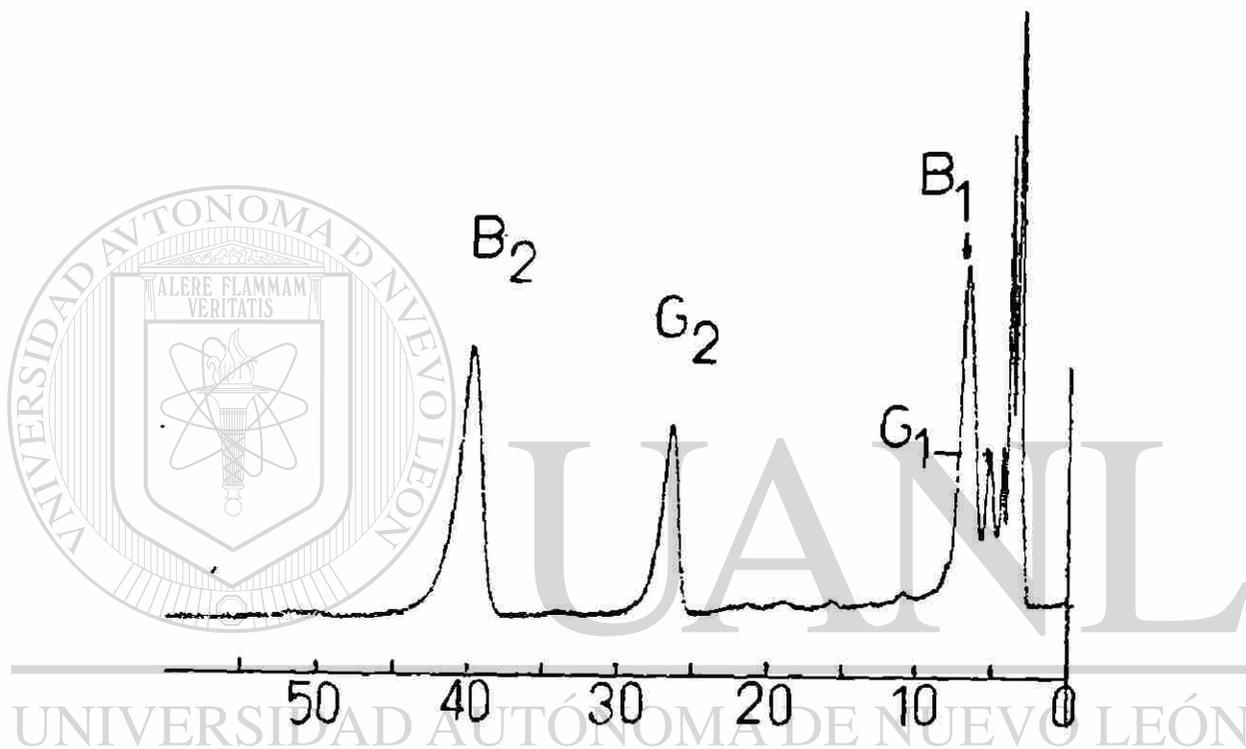
El principal objetivo de la presente investigación estuvo dirigido al estudio de la adaptabilidad de métodos directos para la cuantificación de aflatoxinas a niveles de partes por billón a partir de muestras contaminadas. Para ello se utilizó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (83), como técnica de soporte para supervisar los procedimientos de extracción y purificación y el efecto de la matriz de las muestras sobre las mediciones directas.

Ambos modos de detección fisicoquímica: absorción ultravioleta y fluorescencia molecular se usaron para comparar los límites de detección de las toxinas.

Debido a que la recuperación de las aflatoxinas depende de la cantidad con la que las muestras están contaminadas (Tablas II-IV), el criterio que se tomó para calcular los límites de detección se basó en la selección de las muestras cuya contaminación natural o enriquecimiento de aflatoxinas fuera la menor entre todas las ensayadas. Es decir, no se pretendió hacer regresiones lineales por-[®] que los rangos de contaminación o enriquecimiento fueron muy grandes.

Métodos por HPLC.

Para el cálculo de los límites de detección se eligió el criterio de alturas y no el de áreas por dos razones: la primera, porque los cromatogramas ideales debieran carecer de anchos de banda, y segundo, porque el límite de detección sería menor para una analito que no tuviera ancho de banda en relación a uno que lo tuviera.



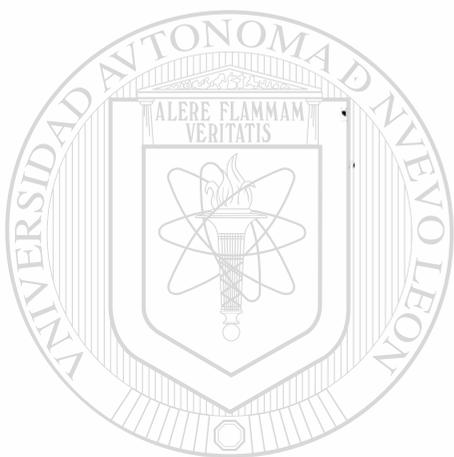
MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON 90 NG/G DE AFLATOXINAS
 TOTALES.
 METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.
 DETECCION POR FLUORESCENCIA.
 SENSIBILIDAD: 0.2 x 5 MV.
 PORCENTAJES DE RECUPERACION NO CALCULADOS SOBRE LA MUESTRA.

FIG. 32

B2

B1

G2



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 15 NG/G

G 2: 20 NG/G

B 2: 16 NG/G

METODO DE EXTRACCION LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

SENSIBILIDAD: 0.05×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: E 1: 90 % G 2: 88 % B 2: 90

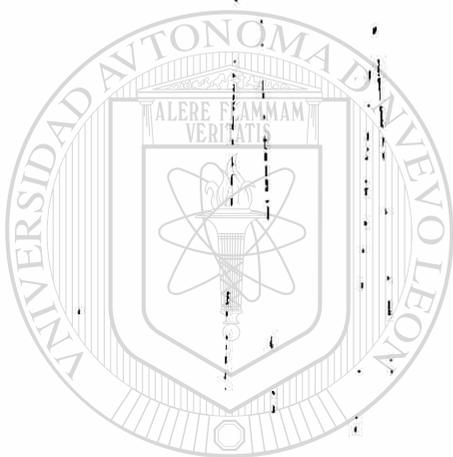
FIG. 33

128

B1

B2

G2



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

40

30

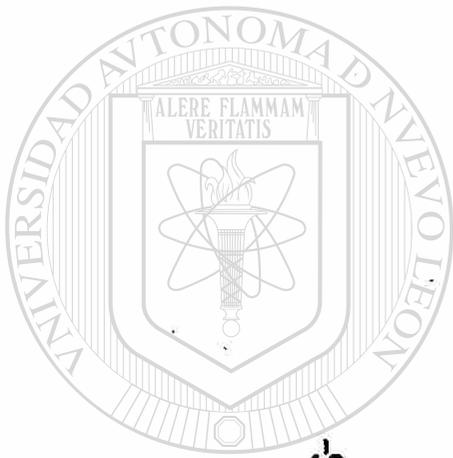
20

5

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:
B 1: 30 NG/G G 2: 25 NG/G B 2: 20 NG/G
VOLUMEN DE RECUPERACION: 1 ML. METODO: LIQ-LIQ MOD.
SENSIBILIDAD: 0.05×10 MV.
FLUJO: 1.5 ML/MIN. DETECCION: FLUORESCENCIA.
FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)
RECUPERACION: B 1: 90 % G 2: 80 % B 2: 85 %

FIG. 34

129



82

62

81

UANL

40

30

20

10

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 110 NG/G G 2: 170 NG/G B 2: 150 NG/G

METODO DE EXTRACCION: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

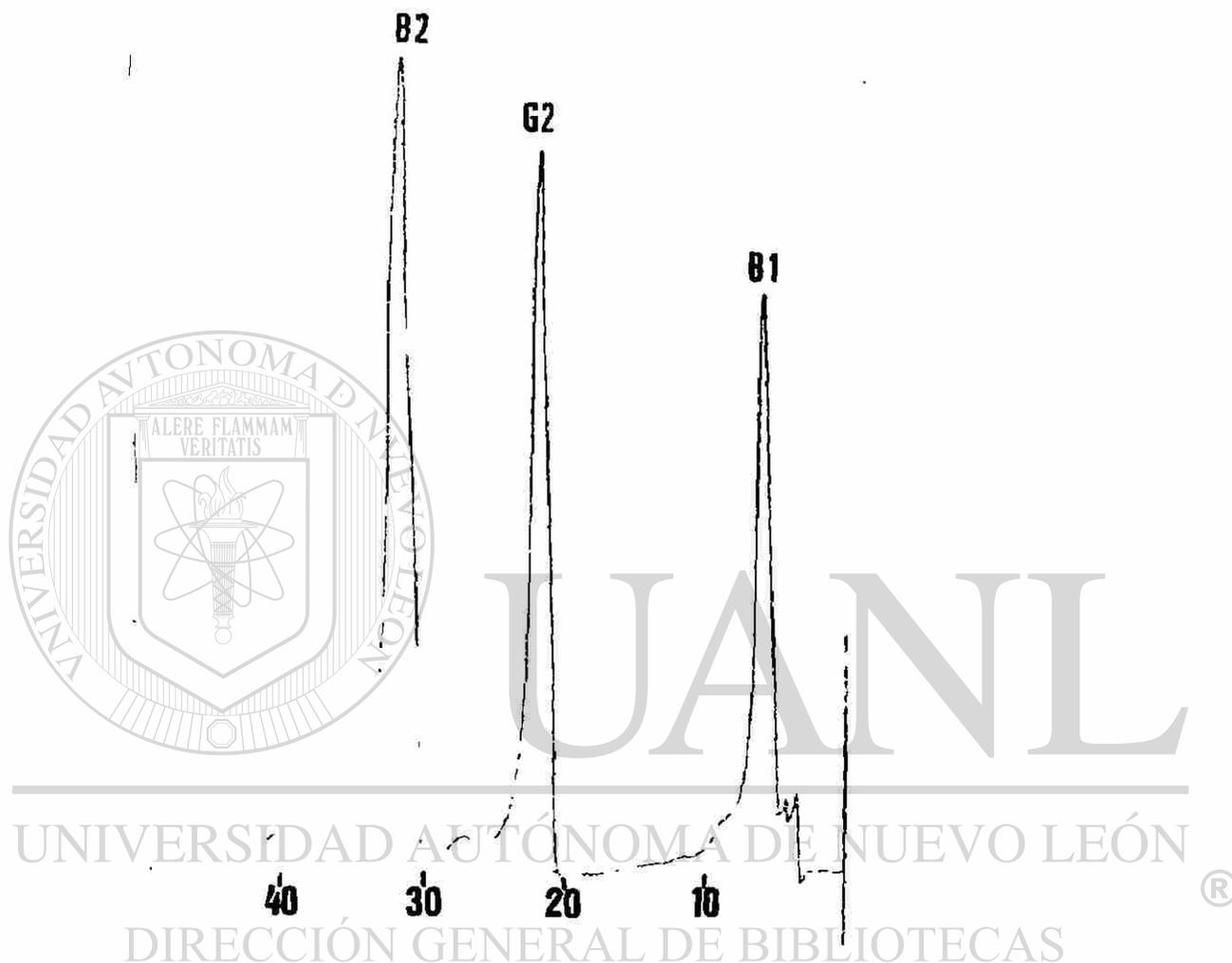
SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂ (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 91 % G 2: 87 % B 2: 94 %

FIG. 35



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 160 NG/G G 2: 270 NG/G B 2: 240 NG/G

METODO DE EXTRACCION: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

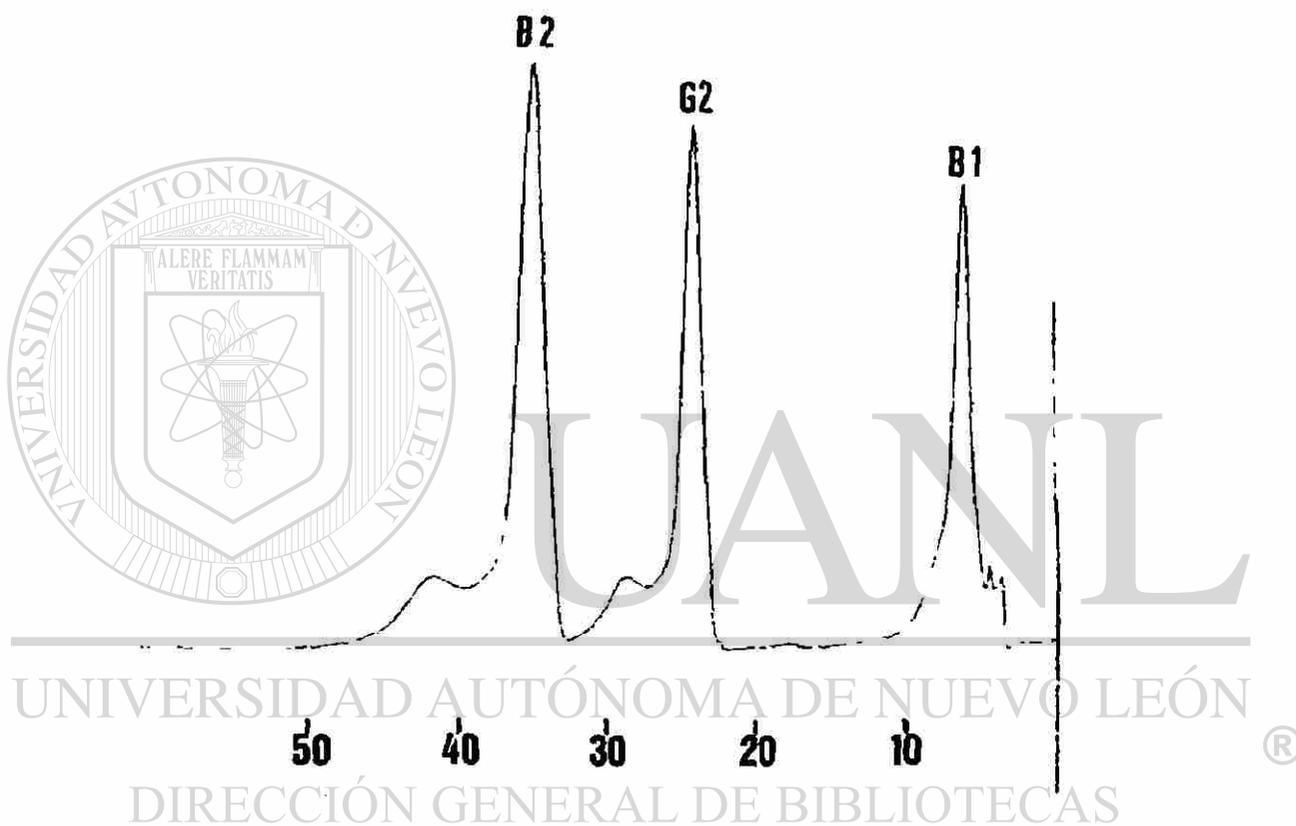
SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 88 % G 2: 89 % B 2: 95 %

FIG. 36



MUESTRA: NUEZ ENRIQUECIDA CON AFLATOXINAS:

B 1: 120 NG/G G 2: 170 NG/G B 2: 160 NG/G

METODO DE EXTRACCION: LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO.

VOLUMEN DE RECUPERACION: 3 ML.

DETECCION POR FLUORESCENCIA.

SENSIBILIDAD: 0.2×10 MV.

FLUJO: 1.5 ML/MIN.

FASE MOVIL: MeOH + H₂O (60 + 40)

RECUPERACION: B 1: 88 % G 2: 94 % B 2: 93 %

FIG. 37

TABLA IV.

PORCENTAJES DE RECUPERACION DEL METODO LIQUIDO-LIQUIDO MODIFICADO
USADO PARA LA EXTRACCION DE AFLATOXINAS A PARTIR DE NUEZ.

AFLATOXINA	MEDIA	DESVIACION ESTANDAR	LIMITES DE CONFIABILIDAD* AL 95 %
------------	-------	---------------------	-----------------------------------

B 1	89.4 %	1.34 %	89.4 + 1.91 %
G 2	88.2 %	5.40 %	88.2 + 7.70 %
B 2	91.0 %	4.0 %	91.0 + 5.70 %

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

No se hicieron las mediciones para G 1.

*EVALUACION A PARTIR DE CINCO MUESTRAS.

Para el caso de los límites de detección de fluorescencia por HPLC, la relación de intensidades aquí reportada para las cuatro aflatoxinas ya había sido descrita previamente (89).

A pesar de que no se conoció el porcentaje de recuperación de la aflatoxina G 1 en la nuez, porque los estándares no cumplieron las especificaciones de la AOAC (81), sí se logró sugerir un criterio de medición para proponer su límite de detección. Se supuso que la relación de los límites de detección de B 1 y G 1 se conservaría igual tanto para el cacahuete como para la nuez. Así, se sugirió tomar como parámetro de referencia la relación de límites de detección obtenidas a partir del cacahuete y extrapolarla al caso de la nuez. Lo anterior puede considerarse como lo más cercano, ya que ambas aflatoxinas B 1 y G 1 fueron sometidas al proceso de derivatización, el cual las condujo a una polaridad semejante y además porque el proceso de extracción del cacahuete es el más parecido al de la nuez. Adicionalmente, porque en la relación de los límites de detección no solamente van implícitos los porcentajes de recuperación sino también la reproducibilidad de los cromatogramas. Los límites de detección por HPLC-fluorescencia pueden observarse en la tabla V.

Para el caso de los límites de detección de UV por HPLC, varios ensayos realizados previamente con estándares demostraron que esta técnica no permitiría cuantificar aflatoxinas dentro del rango de interés toxicológico. Por lo anterior, se decidió no practicar cromatogramas HPLC-UV a partir de muestras contaminadas. Los cromatogramas se hicieron únicamente para los estándares. A partir de ellos se sugirieron los límites de detección que podrían ser obtenidos para las muestras. Para los cálculos se consideraron los porcentajes de recuperación (Tabla VI).

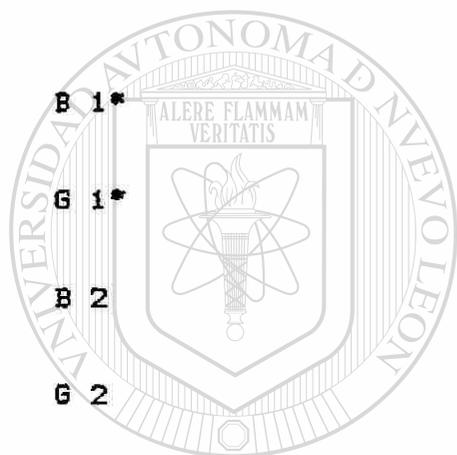
Métodos directos.

En lo referente a los métodos directos por absorción ultravioleta, varios ensayos realizados sobre estándares demostraron que esta técnica tampoco permitiría cuantificar las aflatoxinas dentro de los rangos de interés. Las lecturas se hicieron solamente para estándares, a partir de los cuales se sugirieron los límites de detección que podrían ser obtenidos para las muestras (Tabla VI). Los estándares que se escogieron fueron los que presentaron la absorbancia más baja dentro de una recta de calibración que se hizo para cada aflatoxina.

TABLA V.

LIMITES DE DETECCION DE AFLATOXINAS USANDO HPLC CON DETECCION DE FLUORESCENCIA.

	MAIZ (PPB)	CACAHUATE (PPB)	NUEZ (PPB)
AFLATOXINAS			
B 1*	0.50	0.08	0.18
G 1*	0.40	0.15	0.36
B 2	0.80	0.08	0.14
G 2	1.0	0.15	0.24



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

* DERIVATIZADA CON ACIDO TRIFLUOROACETICO.

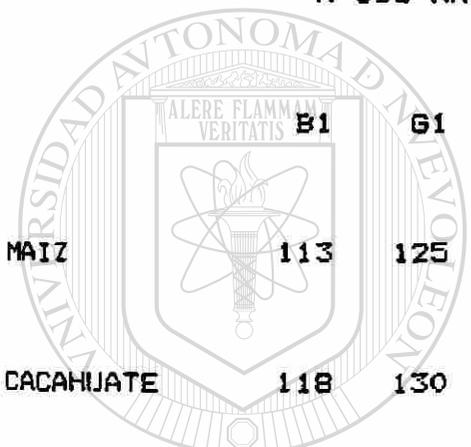
DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA VI.

LIMITES DE DETECCION DE AFLATOXINAS DESPUES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION Y REFINACION.

LIMITES DE DETECCION (PPB)

MUESTRAS	DETECCION DIRECTA UV A 365 NM.				DETECCION UV CON SEPARACION HPLC.			
	B1	G1	B2	G2	B1	G1	B2	G2
MAIZ	113	125	96	126	68	44	25	29
CACAHUATE	118	130	100	130	72	45	26	30
NUEZ	127	140	108	140	73	46	28	32



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS 136

Para el caso de los límites de detección de las lecturas directas por fluorescencia, se presentaron ciertas dificultades que dependieron del tipo de muestra; así, por ejemplo, el maíz presentó compuestos interferentes y fondo de fluorescencia (Figs. 38-46) que impidieron calcular los límites de detección a excepción de B 1. Pero no sucedió así con el cacahuete y la nuez en donde no se presentaron interferencias, o si las hubo, se pudieron eliminar.

En el caso específico del maíz, solamente se obtuvo el límite de detección de B 1 derivatizada (Tabla VII), lo cual fue posible debido a su alta intensidad de fluorescencia en relación a la de los metabolitos interferentes. Aunque no se obtuvieron experimentalmente los límites de detección para el resto de las aflatoxinas, si se sugirieron los cálculos en función de los estándares y de los porcentajes de recuperación. Para ello se supuso que no existirían interferencias.

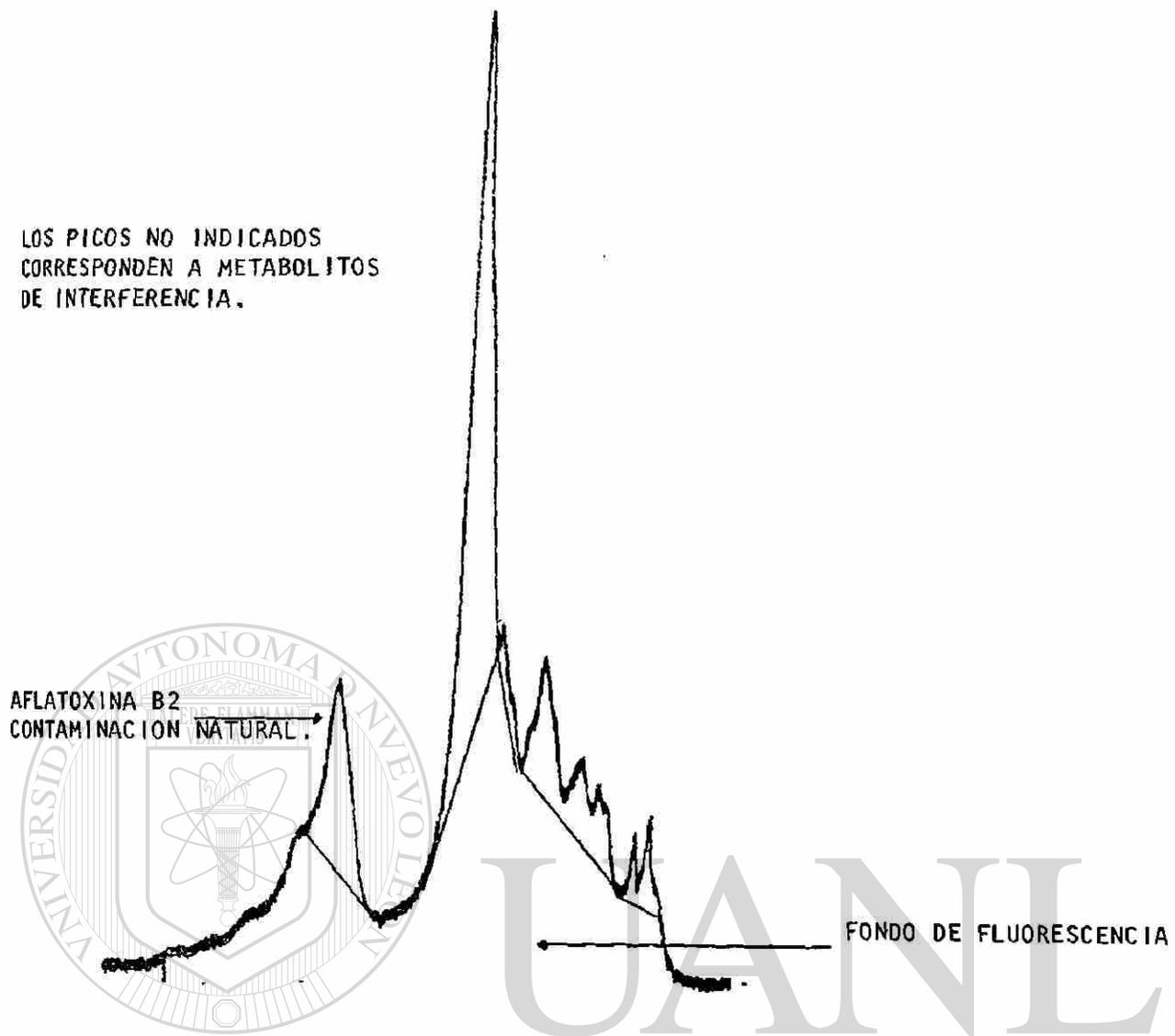
Ensayos hechos sobre fluorescencia directa del maíz revelaron que la intensidad emitida por los metabolitos interferentes y el fondo de fluorescencia fue significativa en relación a la emitida por las aflatoxinas (Tablas VIII-X). Mediante el uso de HPLC se pudo ver que el área de los cromatogramas se amplificó para cada aflatoxina de subíndice 1 cuando fueron derivatizadas; lo cual no solamente no ocurrió cuando las muestras se contaminaron con ellas sin derivatizar, sino que ni siquiera fueron detectadas. También se observó una reducción en la fluorescencia de fondo (Tablas XI-XIII).

Al evaluar la fluorescencia de fondo se encontró que ella depende del tipo de maíz y también que, cuando las muestras se enriquecieron con 5 ng/q de cada aflatoxina, la derivatización intensificó su fluorescencia por aproximadamente tres veces en relación a la de las muestras no derivatizadas (Tablas VIII-X).

En general, para todas las muestras analizadas, el método de separación por HPLC demostró ser más sensible que las determinaciones directas, tanto por fluorescencia molecular como por absorción ultravioleta.

Las determinaciones directas por fluorescencia resultaron ser más sensibles que las mismas por UV (Tablas VI y VII).

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 1 SOLO
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.150 G.
DETECTOR: BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 38

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA

EL ENRIQUECIMIENTO DE B1
(5 ng/g) NO LLEGA A SER DETECTADO.

ESTA SALIENTE CORRESPONDERIA
A G2 (NO SE SEPARO)

AFLATOXINA B2

FONDO DE FLUO-
RESCENCIA.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

MUESTRA : MAIZ BLANCO NO.1 + AFLATOXINAS
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.155 G
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR: BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 39

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS DE INTERFERENCIA.

← AFLATOXINA B1
DERIVATIZADA.

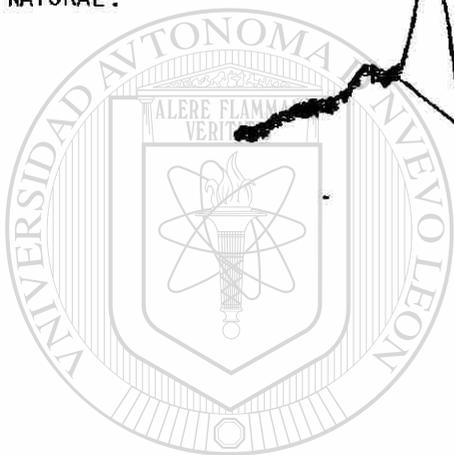
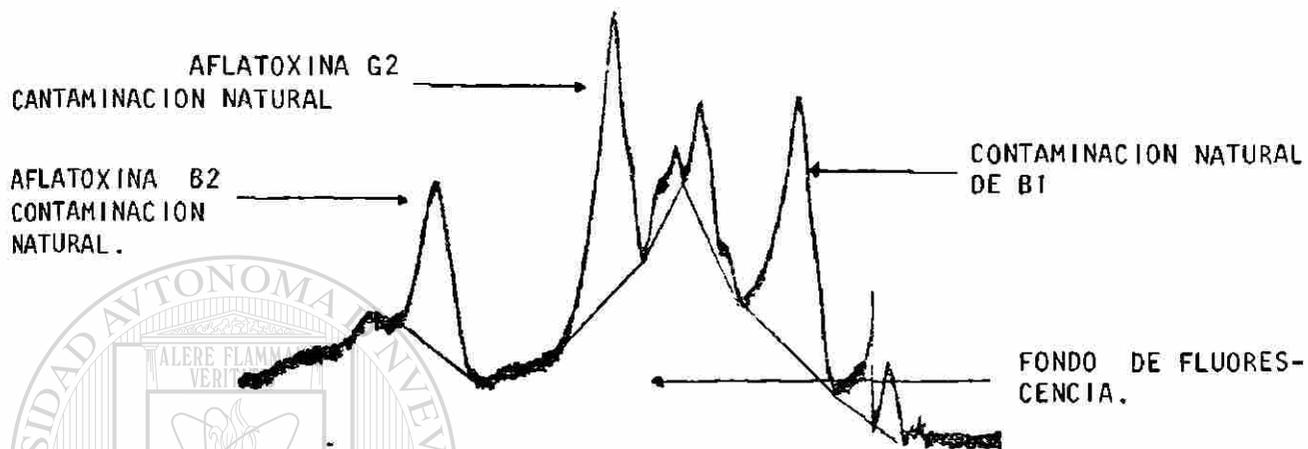
ESTA SALIENTE ES DE G2

← AFLATOXINA B2

← FONDO DE FLUORES-
FLUORESCENCIA.

MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 1 + AFLATOXINAS + TFA
MUESTRA DERIVATIZADA
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.279 G.
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION: 365, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



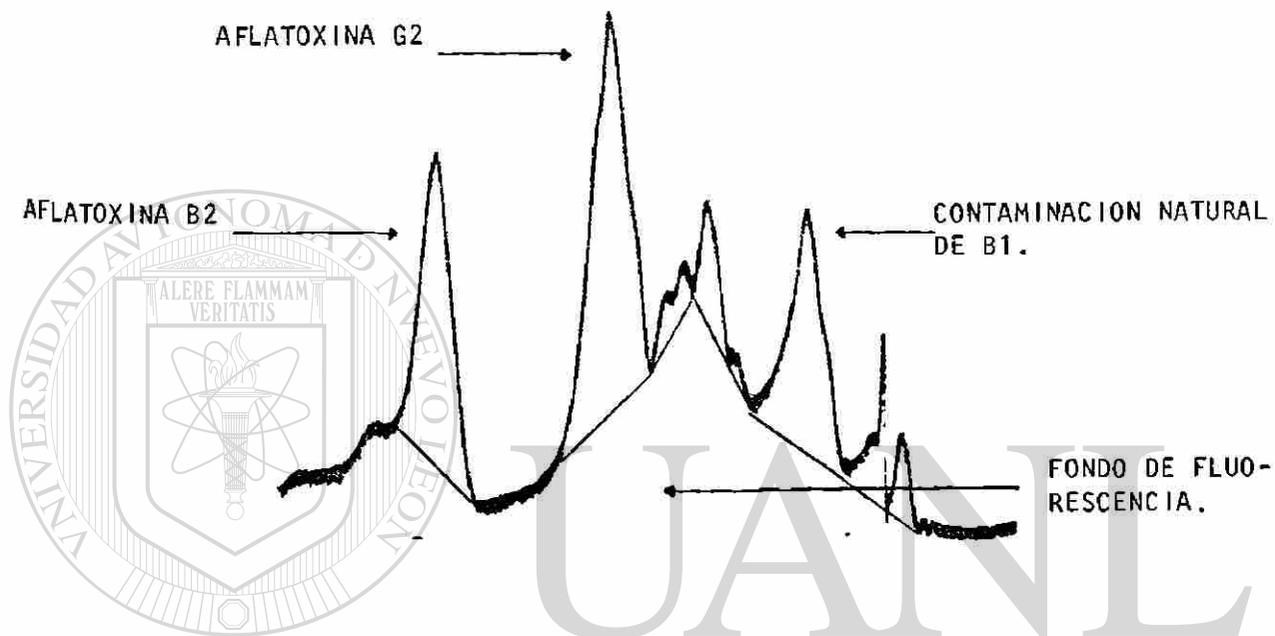
UANL

MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 2 SOLO
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.138 G
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

FIG. 41

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

MUESTRA : MAIZ BLANCO No. 2 + AFLATOXINAS
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.143 G
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 42

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

AFLATOXINA B1
DERIVATIZADA.

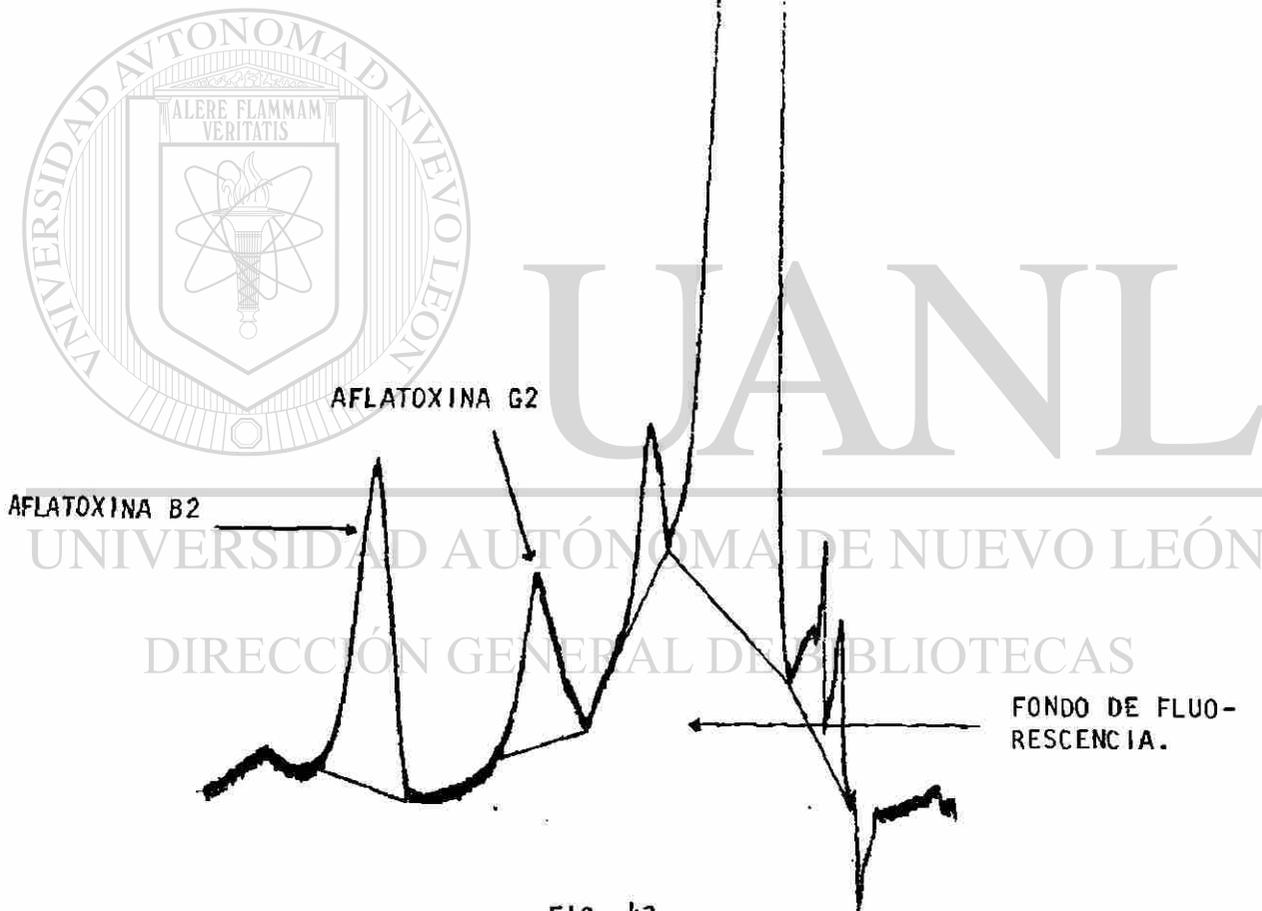
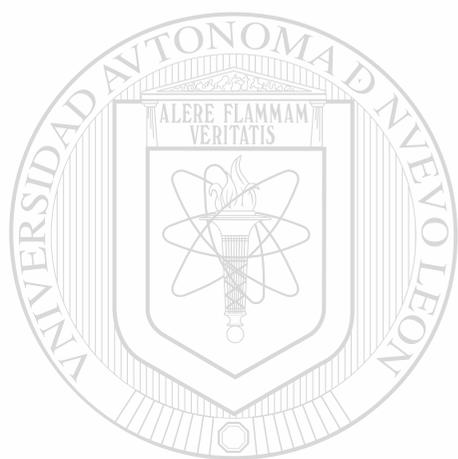


FIG. 43

MUESTRA : MAIZ BLANCO No.2 + AFLATOXINAS + TEA
MUESTRA DERIVATIZADA
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.211 G
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
DETECTOR : BECKMÁN MODELO 157
(EXCITACION : 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONTAMINACION NATURAL DE
AFLATOXINA B2

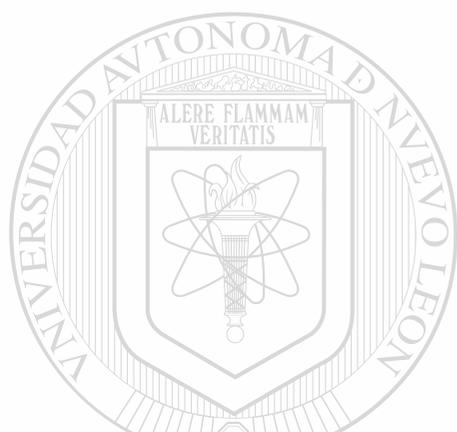
FONDO DE FLUORESCENCIA

MUESTRA : MAIZ AMARILLO SOLO
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.309 GR.
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION 365 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 44

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

EL ENRIQUECIMIENTO DE B1
(5 ng/g) NO LLEGA A SER
DETECTADO.

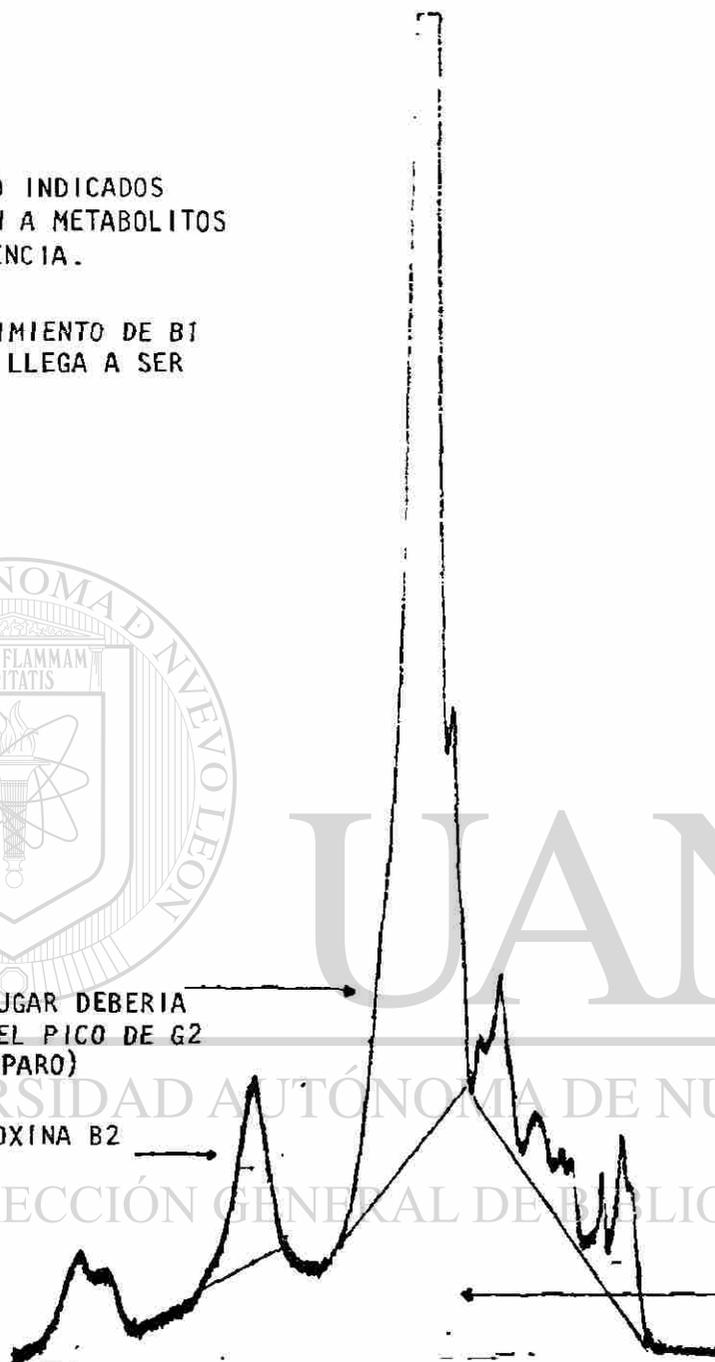


UANL

EN ESTE LUGAR DEBERIA
APARECER EL PICO DE G2
(NO SE SEPARO)

AFLATOXINA B2

FONDO DE FLUO-
RESCENCIA.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

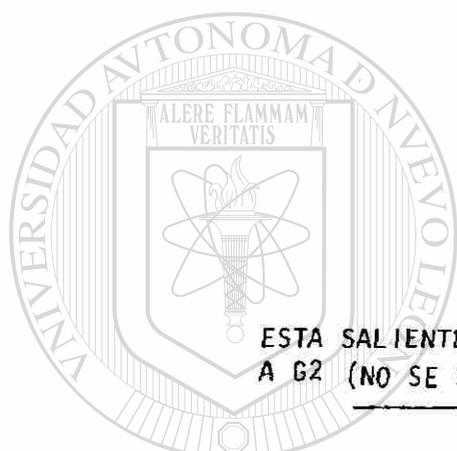
®

MUESTRA : MAIZ AMARILLO + AFLATOXINAS
AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ
PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.337
DETECTOR : BECKMAN MODELO 157
(EXCITACION : 385 NM, EMISION : 450 NM)
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 45

LOS PICOS NO INDICADOS
CORRESPONDEN A METABOLITOS
DE INTERFERENCIA.

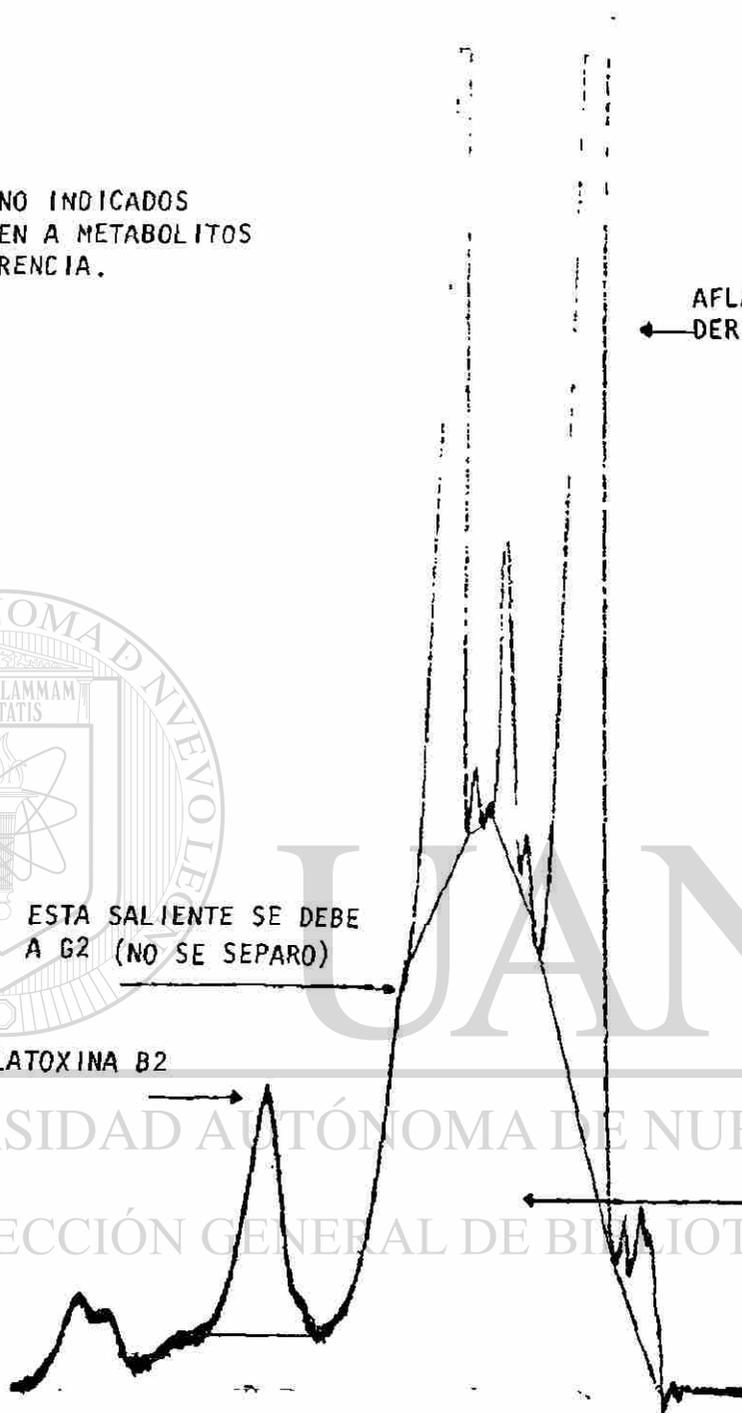
← AFLATOXINA B1
DERIVATIZADA.



ESTA SALIENTE SE DEBE
A G2 (NO SE SEPARO)

AFLATOXINA B2

← FONDO DE FLUORESCENCIA.



MUESTRA : MAIZ AMARILLO + AFLATOXINAS + TFA

MUESTRA DERIVATIZADA

AFLATOXINAS ENRIQUECIDAS : B1, G2, B2, 5 NG/G DE MAIZ

PESO TOTAL CROMATOGRAMA : 0.515 G

DETECTOR : BECKMAN MODELO 157

(EXCITACION : 365 NM, EMISION : 450 NM)

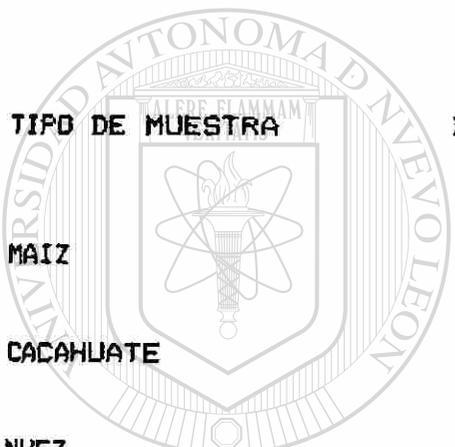
SENSIBILIDAD : 0.05 X 5 MV

FIG. 46

TABLA VII.

LIMITES DE DETECCION DE AFLATOXINA B 1* USANDO DETECCION POR FLUORESCENCIA DESPUES DE LOS PROCEDIMIENTOS DE EXTRACCION Y REFINACION.

LIMITES DE DETECCION (PPB)



TIPO DE MUESTRA	DETECCION DIRECTA	DETECCION CON SEPARACION HPLC
MAIZ	0.82	0.50
CACAHUATE	0.87	0.08
NUEZ	0.94	0.18

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



* DERIVATIZADA CON ACIDO TRIFLUOROACETICO.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

EVALUACION DE LA CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS DETERMINACIONES DIRECTAS A PARTIR DE MUESTRAS DE MAIZ.

Las siguientes abreviaturas se han utilizado en las tablas de las contribuciones que se muestran enseguida.

T : Fluorescencia total.

M : Fluorescencia o en su caso área de los metabolitos.

F.F. : Fluorescencia o en su caso área del fondo fluorescente.

I.T. : Interferencia total.

A.P.M. : Fluorescencia o en su caso área de las aflatoxinas propias de la muestra (contaminación natural que presentó el maíz).

A. E. : Concentración de aflatoxinas con la que se enriqueció el maíz (5 ng/g de cada una).

M.E. : Maíz enriquecido con 5 ng/g de cada aflatoxina.

M.E.D. : Maíz enriquecido derivatizado.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA VIII

CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS MEDICIONES DIRECTAS
DESPUES DE LA EXTRACCION Y REFINACION.

UNIDADES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA

MUESTRA	T	M	F.F	I.T.	A.P.M.			A.E.		
					B1	G2	B2	B1	G2	B2
								5 NG/G C/U		
MAIZ BLANCO No. 1					B1	G2	B2	B1	G2	B2
Maiz SOLO	27	9.9	15.4	25.3	0	0	1.7	0	*	0
M.E.	28	11.4	13.5	24.9	0	0	1.8	0	*	1.3
M.E.D.	83	8	38	46	0	0	3.3	29.4	ND	3.8

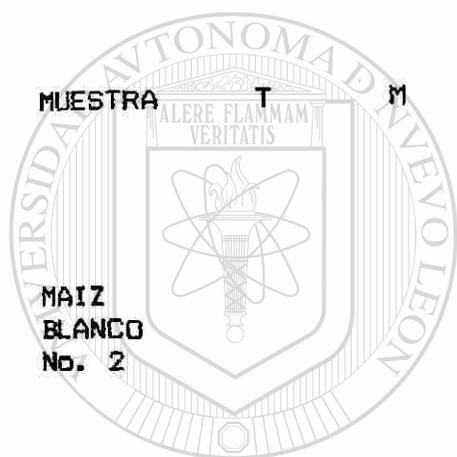
* Se desconoce porque no se separò en el cromatograma.

ND : No se detecta a la cantidad en la que està presente.

TABLA IX.

CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS MEDICIONES DIRECTAS
DESPUES DE LA EXTRACCION Y REFINACION.

UNIDADES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA



MUESTRA T M
MAIZ
BLANCO
No. 2

F.F I.T A.P.M. A.E
5 NG/G C/U
B1 G2 B2 B1 G2 B2

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
MAIZ SOLO 23 2.1 15.1 17.2 2.3 2.1 1.3 0 0 0

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

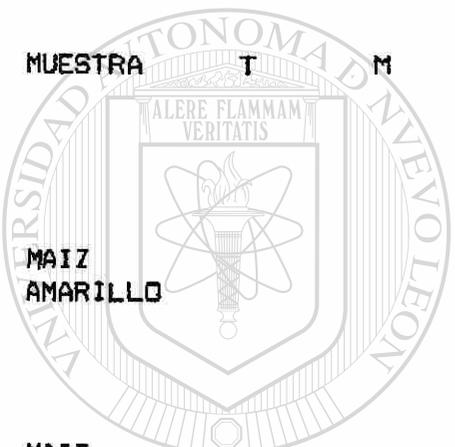
M.E. 32 3 17.6 20.6 2.8 2.2 1.8 0 2.8 1.7

M.E.D. 103 7.7 34.6 42.3 6.8 4.8 3.9 41 0 3.9

TABLA X.

CONTRIBUCION DEL FONDO DE FLUORESCENCIA EN LAS MEDICIONES DIRECTAS
DESPUES DE LA EXTRACCION Y REFINACION.

UNIDADES DE INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

ALERE FLAMMAM VERITATIS

MUESTRA	T	M	F.F	I.T	A.P.M.	A. E.				
					B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ AMARILLO										
MAIZ SOLO	19	9.6	8.7	18.3	0	0	ND	0	0	0
M.E.	24	11.8	11	22.8	0	0	ND	0	*	0 [®]
M.E.D.	46	8	25.4	33.4	0	0	1.6	10	*	0

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

* Se desconoce porque no se separò en el cromatograma.

ND : no se detecta a la cantidad en la que està presente.

TABLA XI.

PORCENTAJES DE AREAS EN LAS MEDICIONES DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

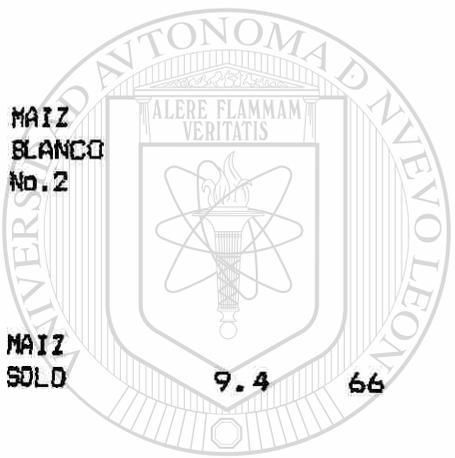
MUESTRA	M	F.F.	I.T.	A.P.M.			A.E.			
				B1	G2	B2	B1	G2	B2	
							5	NG/G	C/U	
MAIZ BLANCO No. 1										
MAIZ SOLD	36.7	57.1	93.8	0	0	6.2	0	*	0	
M.E.	40.6	48.4	89	0	0	6.5	0	*	4.5	
M.E.D.	9.6	45.9	55.5	0	0	3.9	35.3	0.7	4.6	

* Se desconoce porque no se separó en el cromatograma.

TABLA XII.

PORCENTAJES DE AREAS EN LAS MEDICIONES DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

MUESTRA	M	F.F.	I.T.	A.P.M.			A.E.		
				B1	G2	B2	B1	G2	B2
							5 NG/B	C/U	
MAIZ BLANCO No. 2									
MAIZ SOLD	9.4	66	75.4	10	9	5.6	0	0	0
M.E.	9.6	55	64.6	8.7	7.0	5.6	0	8.8	5.3 [®]
M.E.D.	7.5	33.6	41.1	6.6	4.7	3.8	39.8	0	3.8



UANL

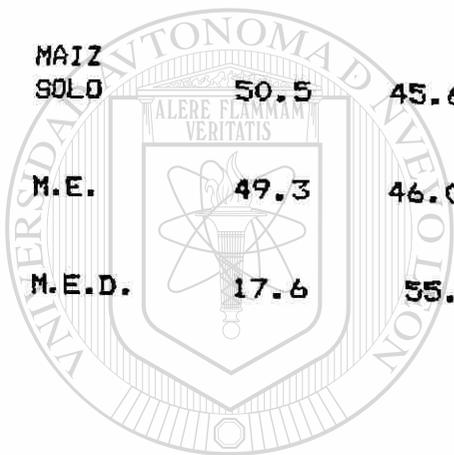
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA XIII.

PORCENTAJE DE AREAS EN LAS MEDICIONES DE FLUORESCENCIA POR HPLC.

MUESTRA	M	F.F	I.T.	A.P.M.			A.E.		
				B1	G2	B2	B1	G2	B2
							5 NG/G C/U		
MAIZ AMARILLO				B1	G2	B2	B1	G2	B2
MAIZ SOLO	50.5	45.6	96.1	0	0	3.9	0	0	0
M.E.	49.3	46.0	95.3	0	0	3.8	0	*	0.9
M.E.D.	17.6	55.3	73.1	0	0	3.3	21.7	*	2



UANL 154

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



CONCLUSIONES

A partir de los experimentos realizados y de los resultados obtenidos en el transcurso de la presente investigación, se llegó a las siguientes conclusiones:

1. Los métodos directos de absorción ultravioleta carecen de la suficiente sensibilidad para llevar a cabo análisis de aflatoxinas dentro de los rangos de interés toxicológico en todas las muestras ensayadas.
2. Los métodos de fluorescencia directa tienen apropiada sensibilidad para la cuantificación de aflatoxinas en maíz, cacahuate y nuez. Sin embargo, cuando se aplica al maíz, los resultados muestran que los análisis son altamente influidos por los efectos de matriz.
3. Debido a que la fluorescencia de la aflatoxina B₁ es baja y comparativamente menor en relación a las otras aflatoxinas, es necesario llevar a cabo el procedimiento de derivatización a fin de incrementar la señal.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

C A P I T U L O 4

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Betina, V. Mycotoxins, Production, Isolation, Separation and Purification. Developments in Food Science No. 8, Elsevier, Amsterdam, 1984, 89-130.
- 2.- Nesbitt, B.F.; O'Kelly, J.; Sargeant, K.; Sheridan, A. Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 1962, 195 (4846) 1062-1063.
- 3.- Hartley, P.D.; Nesbitt, B.P.; O'Kelly, J. Toxic Metabolites of *Aspergillus flavus*. *Nature* 1963, 198 (4885), 1056-1058.
- 4.- Anderson, H.W.; Nehring, E.W.; Wichse, W.R. Aflatoxin Contamination of Corn in the Field. *J. Agric. Food Chem.* 1975, 23, 775-782.
- 5.- Park, D.L.; Njapau, H. Contamination Issue, Technology. *J. Amer. Oil Chem. Soc.* 1989, 66 (10) 1402-1408.
- 6.- Plattner, R.D. Identification of Aflatoxins by Quadrupole Mass Spectrometry/ Mass Spectrometry. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (6) 734-738.
- 7.- Velasco, J. Fluorometric Measurement of Aflatoxins Adsorbed on Florisil in Minicolumns. 1975, 58 (4) 757-763.
- 8.- Panalaks, T.; Scott, P.M. Sensitive Silica Gel-Packed Flowcell for Fluorometric Detection of Aflatoxins by High Pressure Liquid Chromatography. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1977, 60 (3) 583-589.
- 9.- Cohen, H.; Lapointe, M. High Pressure Liquid Chromatographic Determination and Fluorescence Detection of Aflatoxins in Corn and Dairy Feeds. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1981, 64 (6) 1372-1376.
- 10.- Francis, O.J. Jr.; Lipinski, L.J.; Gaul, J.A.; Campbell, A.D. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Peanut Butter by Using a Silica Gel-Packed Flowcell for Fluorescence Detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1982, 65 (3) 685-689.

- 11.- Francis, D.J. B-Cyclodextrin Post-Column Fluorescence Enhancement of Aflatoxins for Reverse Phase Liquid Chromatographic Determination in Corn. 1988, 71 (4) 725-728.
- 12.- Stoloff, L; Dalrymple, B. Aflatoxin and Zearalenone Occurrence in Dry-Milled Corn Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977 60 (3) 579-582.
- 13.- Asao, T.; Buchi, G.; Abdel-Kader M.; Chang, S.P.; Wick, E.L.; Wogan, G.M. Aflatoxins B and G. J. Amer. Chem. Soc. 1963, 85, 1706-1707.
- 14.- Chang, S.P.; Abdel-Kader, M.M.; Wick, E.L.; Wogan, G.M. Aflatoxin B₂. Chemical Identity and Biological Activity Science 1963, 142, 1191-1192.
- 15.- van der Merwe, K.J.; Fourie, L.; Scott, B. The Structure of The Aflatoxins. Chem. Ind. 1963, 41, 1660-1661.
- 16.- van Dorp, D.A.; van der Beerthius, A.S.M.; Sparrebom, S.; Ord, W.O.; de Jong, K.; Keuning, R. Dihydroaflatoxin B₁ a metabolite of *Aspergillus flavus*, Remarks on The Structure of Aflatoxin B. Rec. Trav. Chim. 1963, 82, 587-592; cit. pos CA 59, 11803 d.
- 17.- Wogan, G.N. Experimental Toxicity and Carcinogenicity of Aflatoxins. Mycotoxins in Foodstuffs. 1965, 163-173.
- 18.- Bauer, D.; Lee, D.J.; Sinnhuber, R.O. Acute Toxicity of Aflatoxins B₁ and G₁ in the Rainbow Trout (*Salmo gairdneri*) Toxicol. Appl. Pharmacol. 1969, 15, 415-419.
- 19.- Pohland, A.E.; Yin, L; Dantzman, J.G. Rapid Chemical Confirmatory Method for Aflatoxin B₁ I. Development of The Method. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53, (1) 101-102.
- 20.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L.; Shannon, G.M. Aflatoxins: Improved Resolution By Thin Layer Chromatography. J. Assoc. Offic. Anal. Chem. 1969, 52, 669-672.
- 21.- Lafont P.; Frayssinet, C. Isolement d'une nouvelle aflatoxine: l'aflatoxine 3 B Cah. Nutr. Diét. 1970, 5, 78.
- 22.- Detroy, R.W.; Hesseltine, C.W. Secondary Biosynthesis of Aflatoxin B₁ in *Aspergillus parasiticus*. Can. J. Microbiol. 1970, 14, 959-963.

- 23.- Wogan, G.N.; Newberne, P.M. Dose-Response Characteristics of Aflatoxin B Carcinogenesis in The Rat. *Cancer Res.* 1967, 27, 2370-2376.
- 24.- Dalezios, J.; Wogan, G.N.; Weinreb, S.M. Aflatoxin P 1: A New Aflatoxin Metabolite in Monkeys *Science.* 1971, 171, 584-585.
- 25.- Lee, L.S.; Stanley, J.B.; Cucullu, A.E.; Pons, W.A. Jr. Ammoniation of Aflatoxin B 1. Isolation and Identification of the Major Reaction Product. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1974, 57 (3) 626-631.
- 26.- Jackson, C.R. Peanut Pod Microflora and Kernel Infection. *Plant and Soil.* 1965, 23, 203-212.
- 27.- Austwick, P.K.C.; Ayerst, G. Toxic Products in Groundnuts: Groundnut Microflora and Toxicity. *Chemistry and Industry.* 1963, 2, 55-61.
- 28.- Lee, E.G.H.; Townsley P.M.; Walden C.C. Effect of bivalent Metals on The Production of Aflatoxins in Submerged Cultures. *Food. Sci.* 1966, 31, 432-436.
- 29.- Davis, N.D.; Diener, U.L.; Agnihotri, V.P. Production of Aflatoxins B 1 and G 1 in Chemically Defined Medium (by *Aspergillus flavus*. *Mycopathol. Mycol. Appl.* 1967, 31, 251-256.
- 30.- Carnaghan, R.B.A.; Hartley, R.O.; O'Kelly, J. Toxicity and Fluorescence Properties of The Aflatoxins. *Nature.* 1963, 200, 1101.
- 31.- Butler, W.H. Acute Toxicity of Aflatoxin B 1 in Rats. *Brit, J. Cancer.* 1964, 18, 756-762.
- 32.- Portman, R.S.; Plowman, K.M.; Campbell, T.C. Aflatoxin Metabolism by Liver Microsomal Preparations of Two Different Species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1968, 33, 711-715.
- 33.- Delage, J. Contribution A L' Etude Des Rêpercussions De La Présence D'Aflatoxine Dans Des Rêgimes D'Animaux Domestiques. *Colloque Aflatoxines Villejuif,* 1966, 7

- 34.- Fehr, P.M.; Delage, J.; Richir, C. Répercussions De L'Ingestion D'Aflatoxine Sur Le Lapin en Croissance. Cah. Nutr. Diét. 1970, 5, 62-64.
- 35.- Gedek, B.; Hofmann, H. Tierexperimentelle Untersuchungen Zur Hepatotoxischen Wirkung Von Schimmelpilzgiften I. Mitteilung; Akute Veränderungen Beim Meeresschweinchen. Zentralbl. Veterinärmed. 1970, 17, 658-666.
- 36.- Elis, J.; Dipaolo, J.A. Aflatoxin B1: Induction of malformations. Arch. Pathol. 1967, 83, 53-57.
- 37.- Armbrrecht, B.H.; Shalkop, W.T.; Wiseman, H.G.; Jackson, J.E.; Zimmerman, H.E. The Effects Produced in Brood Sows by Feeding Aflatoxin. Toxicol. Appl. Pharmacol. 1969, 14, 649-650.
- 38.- Harding, J.D.J.; Done, J.T.; Lewis, G.; Allcroft, R. Experimental Groundnut Poisoning in Pigs. Res. Vet. Sci. 1963, 4, 217-229.
- 39.- Clegg, F.G.; Bryson, H. An Outbreak of Poisoning in Store Cattle Attributed To Brazilian Groundnut Meal. Vet. Rec. 1962, 74, 992-994.
- 40.- Allcroft, R.; Lewis, G. Groundnut (Meal) Toxicity in Cattle: Experimental Poisoning of Calves and A Report on Clinical Effects in Older Cattle. Vet. Rec. 1963, 75, 487-494.
- 41.- Butler, W.H.; Wigglesworth, J.S. The effects of Aflatoxin B 1 on The Pregnant Rat. Brit. J. Exp. Pathol. 1966, 47, 242-247.
- 42.- Sargeant, K.; Sheridan, A.; O'Kelly, J.; Carnaghan, R.B.A. Toxicity Associated With Certain Samples of Groundnuts. Nature, 1961, 192, 1096-1097.
- 43.- Asplin, F.D.; Carnaghan, R.B.A.; The Toxicity of Certain Groundnut Meals for Poultry, With Special Reference to Their Effect on Ducklings and Chickens. Vet. Rec. 1961, 73, 1215-1219.
- 44.- Gardiner, M.R.; Oldroy, B. Avian Aflatoxicosis. Austral. Veter. J., 1965, 41, 272-276.
- 45.- Carnaghan, R.B.A. (Observaciones no publicadas) 1960-1962.

- 46.- Solomon, G.; Jensen, R.; Tanner, H. Hepatic Changes in Rainbow Trout (*Salmo Gairdneri*) Fed Diets Containing Peanut, Cottonseed, and Soybean Meals. *Amer. J. Vet. Res.* 1965, 26, 764-770.
- 47.- Legator, M.S. Biological Assay for Aflatoxins in Goldblatt, L.A. *Aflatoxin*, Academic Press. 1969, 107-149.
- 48.- Frayssinet, C.; Lafont, P. Les Mycotoxines: Un Nouvel Aspect De L'Hygiène Des Aliments. *Cahiers de Nutrition et De Diététique*. 1966, 1, 21-29.
- 49.- Philip, J.M. Eurotox Symposium on Natural Products. Aflatoxin-Mammalian Toxicity. *Food Cosmet. Toxicol.* 1964, 2, 674-675.
- 50.- Sysk, D.B.; Carlton, W.W.; Curtin, T.M. Experimental Aflatoxicosis in Young Swine. *Amer. J. Vet. Res.* 1968, 29, 1591-1602.
- 51.- Garret, W.N.; Heitman, H.; Booth, A.N. Aflatoxin Toxicity in Beef Cattle. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1968, 29, 1591-1602.
- 52.- Ferrando, R.; Henry, N. Les Conséquences Pathologiques Des Aliments Infestés par *Aspergillus flavus*. *Bull. Acad. Nat. Méd.* 1965, 149, 94-103.
-
- 53.- Siller, W.G.; Ostler, D.C. The histopathology of an Enterohepatic Syndrome of Turkey Poults. *Vet. Rec.* 1961, 72, 134-138.
- 54.- Kratzer, F.H.; Bandy, D.; Wiley, M.; Booth, A.N. Aflatoxin Effects in Poultry. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1969, 131, 1281-1284.
- 55.- Joffe, A.Z. Feeding Tests With Ducklings, Turkey, Chicks, and Rabbits and The Effects of Aflatoxin on These Animals. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, 1970, 40, 49-61.
- 56.- Butler, W.H.; Barnes, J.M. Toxic Effects of Groundnut Meal Containing Aflatoxin to Rats and Guinea Pigs. *Brit. J. Cancer.* 1964, 17, 699-710.
- 57.- Butler, W.H.; Lijinsky, W. Acute Toxicity of Aflatoxin G₁ To The Rat. *J. Pathol.* 1970, 102, 209-212.

- 58.- Butler, W.H. Further Ultrastructural Observations on Injury of Rat Hepatic Parenchymal Cells Induced by Aflatoxin B 1. *Chem-Biol. Interactions*. 1971, 4, 49-65.
- 59.- Mietkiewski, K.; Janicki, J.; Malenowicz, L.; Urbanowicz, M; Filipiak, B. Histochemical Studies On The Action of Aflatoxins. I. A Cytological and Cytochemical Study of The Liver of Rats Fed A Diet Contaminated With *Aspergillus flavus*. *Folio Histochem. Cytochem.* 1969, 7, 379-405.
- 60.- Jayraj, A.P.; Shanka-Murti, A.; Sreenivasamurthy, V.; Parpia, H.A.B. Toxic Effects of Aflatoxin on The Testis of Albino Rats. *J. Anat. Soc. India*. 1968, 17, 101-104.
- 61.- Tulpule, P.G.; Madhavan, T.V.; Gopalan, C. Effect of Feeding Aflatoxin to Young Monkeys. *Lancet*. 1964, 1, 962-963.
- 62.- Alpert, E.; Serck-Hanssen, A.; Rajagopalan, B. Aflatoxin-Induced Hepatic Injury in the African Monkey. *Arch. Environ. Health*. 1970, 20, 723-728.
- 63.- Cuthbertson, W.F.J.; Laursen, A.C.; Pratt, D.A.H.; Effect on Groundnut Meal Containing Aflatoxin on *Cynomolgus* Monkeys. *Brit. J. Nutr.* 1967, 21, 893-908.
- 64.- Newberne, P.M.; Carcinogenicity of Aflatoxin-Contaminated Peanut Meals. *Mycotoxins in Foodstuffs*. 1965, 187-208.
- 65.- Newberne, P.M.; Carlton, W.W., Wogan, G.N. Hepatomas in Rats and Hepatorenal Injury in Ducklings Fed Peanut Meal or *Aspergillus flavus* extract. *Pathologia Veterinaria*. 1964, 1, 105-132.
- 66.- Denoix. Le Cancer; Quelques-uns de Ses Aspects. *Bull. M. G.E.N.* 1966, 19 (6), 10-11.
- 67.- Butler, W.H. Liver Injury and Aflatoxin. *Mycotoxins in Foodstuffs*. 1965, 175-186.
- 68.- Frayssinet, C. Recherches Concernant le pouvoir Carcinogène des Toxines de l'*Aspergillus flavus* Link. Rapport d'activité du C.N.R.S. Oct. 1962-Oct 1963. 1963, 460.
- 69.- Frayssinet C.; Lafarge, C. Action de l'aflatoxine Sur La Cellule Hépatique du Rat. *Cah. Nutr. Diét.* 1970, 5, 67-69.

- 70.- Clifford, J.I.; Rees, K.R. Aflatoxin: A Site of Action in the Rat Liver Cell. *Nature*, G.B. 1966, 209, 312-313.
- 71.- Balis, M.E. Antagonists and Nucleic Acid. *Frontiers of Biology*, 10) North Holland Publ. Co, Amsterdam, 1968.
- 72.- Frayssinet, C.; Laferge, C. Etude Du Pouvoir Carcinogène De L'Aflatoxine Rapport D'Activité Du C.N.R.S. Oct.1963-Oct. 1964, 1964, 544-545.
- 73.- Roy, A.K. Effects of Aflatoxin B 1 on Polysomal Profiles and RNA Synthesis in Rat Liver. *Biochim. Biophys. Acta*. 1968, 169, 206-211.
- 74.- Wragg, J.B.; Ross, V.C.; Legator, M.S.; Effect of Aflatoxin B 1 on The Deoxyribonucleic Acid Polymerase of Escherichia Coli (32274). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1967, 125, 1052-1055.
- 75.- King, A.M.Q.; Nicholson, B.H. The interaction of Aflatoxin B 1 With Polynucleotides and Its Effect on Ribonucleic Acid Polymerase. *Biochem. J.* 1969, 114, 679-687.
- 76.- Pong, R.S.; Wogan, G.N. Time Course and Dose Response Characteristics of Aflatoxin B 1 Effects on Rat Liver RNA Polymerase and Ultrastructure. *Cancer Res.* 1970, 30, 294-304.
-
- 77.- Lillehoj, H.B.; Ciegler, A. Inhibition of Deoxyribonucleic Acid Synthesis in *Flavobacterium aurantiacum* by Aflatoxin B 1. *J. Bacter.* 1967, 94, 787-788.
- 78.- Campbell, T.C.; Salamat, L. Aflatoxin Ingestion And Excretion by Humans. In Purchase I.F.K. *Mycotoxins in Human Health*. 1971, 271-280.
- 79.- Lopez, L.C.; Christensen, C.M. Effect of Moisture Content and Temperature on Invasion of Stored Corn by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 1967, 57, 588-590.
- * 80.- van Egmond, H.P. Current situation on regulations for mycotoxins. Overview of tolerances and status of standard methods of sampling and analysis. *Food activities and contaminants*, 1989, 6 (2) 139-188.

- 81.- Official Methods of Analysis 1990, 15th Ed., AOAC, Arlington, VA, secs. 970.43-989.06.
- 82.- Beckman, Liquid Chromatographic Course. Beckman Instruments, Inc. 2500 Harbor Blvd, Fullerton, CA 92634-3100.
- 83.- Fernández-Alonso, M.; Rebolledo-Castillo, R.; Montemayor-Gaytán, C. Determinación de Aflatoxinas en Maíz y Productos Derivados por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución. *Ars. Pharmaceutica* 1986, 27 (4) 493-500.
- 84.- Francis, D.J. Jr.; Ware, G.M.; Carman, A.S.; Kirschenheuter, G.P.; Kuan, S.S. Use of Ten Gram Samples of Corn for Determination of Mycotoxins. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1988, 71 (1) 41-43.
- 85.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Optimización de Parámetros en la Metodología de Preparación de Muestras de Maíz para el Análisis de Aflatoxinas por HPLC. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 267.
- 86.- Whitaker, T.B.; Dickens, J.W.; Giesbrecht, F.G. Effects of Methanol Concentration and Solvent:Peanut Ratio on Extraction of Aflatoxin from Raw Peanuts. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1984, 67 (1) 35-36.
- 87.- Whitaker, T.B.; Dickens, J.W.; Giesbrecht, F.G. Optimum Methanol Concentration and Solvent/Peanut Ratio for Extraction of Aflatoxin from Raw Peanut by Modified AOAC Method II. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 1986, 69 (3) 508-510.
- 88.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Balderas-Mireles, A. Desarrollo de un Método Analítico Para la Determinación de Aflatoxinas en Nuez Mediante Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia Molecular. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 265.
- 89.- Acuña-Askar, K.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Comparación de la Intensidad de Fluorescencia de las Aflatoxinas de Dos Detectores Distintos Acoplados a Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 290.

- 90.- Acuña-Askar, K.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Comparación de los Límites de Detección de Aflatoxinas por Absorción Ultravioleta y Fluorescencia Molecular. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 291.
- 91.- Trucksess, M.W.; Brumley, W.C.; Nesheim, S. Rapid Quantitation and Confirmation of Aflatoxins in Corn and Peanut Butter Using a Disposable Silica Gel Column, Thin Layer Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (5) 973-975.
- 92.- Thean, J.E.; Lorenz, D.R.; Wilson, D.M.; Rodgers, K.; Guedner, R.C. Extraction, Cleanup and Quantitative Determination of Aflatoxins in Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1980, 63 (3) 631-633.
- 93.- Whitaker, T.B.; Dickens, J.W.; Monroe, R.J. Variability of Aflatoxin Test Results. J. Am. Oil Chem. Soc. 1974, 51 214-218.
- 94.- Campbell, A.D.; Whitaker, T.B.; Pohland, A.E.; Dickens, J.W.; Park, D.L. Sampling, Sample Preparation and Sampling Plans for Foodstuffs for Mycotoxin Analysis. Pure and Appl. Chem. 1986, 58 (2) 305-314.
- 95.- Fuller, G.; Spooner, W.W.; King, A.D., Jr.; Schade, J.; Mackey, B. Survey of Aflatoxins in California Tree Nuts. J. Am. Oil Chem. Soc. 1977, 54, 231A-234A
- 96.- Beebe, R.M. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61, 1347-1352. ®
- 97.- Hutchins, J.E.; Hagler, W.M., Jr. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1986, 66, 1458-1465.
- 98.- Takahashi, D.M. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60, 799-804.
- 99.- Fernández-Alonso, M.; Acuña-Askar, K. Evaluation of Physicochemical Methods for Quantitation of Aflatoxins in Foodstuffs. (Manuscrito en preparación). 57

LECTURAS SUGERIDAS

- 1.- Moureau, C. Moulds, Toxins and Food, 1979, 2nd. Ed., John Wiley and Sons, Surrey, 27-143.
- 2.- Lederer, M.; Chromatographic Reviews, J. Chromatogr. 1981, 220, 1-28.
- 3.- Ettre, L.S. The Nomenclature of Chromatography. I. Gas Chromatography . J. Chromatogr. 1979, 165, 235-256.
- 4.- Zuber, M.S.; Lillehoj, E.B.; Renfro, B.L. Aflatoxin in Maize: A Proceeding of the Workshop, 1987, CIMMYT, Mexico, D.F.
- 5.- Ettre, L.S. The Nomenclature of Chromatography, II. Liquid Chromatography . J. Chromatogra. 1981, 220, 29-63.
- 6.- Ettre, L.S. The Nomenclature of Chromatography, III. General Rules for Future Revisions 1981, 220, 65-69.
- 7.- Giddings, J. C. Physico-chemical Basis of Chromatography . J. Chem. Educ. 1967, 44, (12) 704-709.
- 8.- Fischbach, B.; Campbell, A.D. Detoxification of The Aflatoxins . J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 1965, 48 (1), 23.
- 9.- de Jongh, H.; van Felt, J.G.; Ord, W.O.; Barret, C.B. A Semiquantitative Determination of Aflatoxin B₁ in Peanut Meal and Peanut Butter. Vet. Record 1964, 76 (34) 901-903; cit. pos CA 62, 4531 d.
- 10.- Rodricks, J.V.; Stoloff, L. Determination of Concentration and Purity of Aflatoxin Standards . J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53 (1) 92-95.
- 11.- Rodricks, J.V.; Stoloff, L.; Pons, W.A.; Robertson, J.A.; Goldblatt, L.A. Molar Absorptivity Values for Aflatoxins and Justification for their use as Criterial Purity of Analytical Standards . J. Assoc. Off. Anal Chem. 1970, 53 (1) 96-101.
- 12.- Waliking, A.E. Collaborative Study of Three Methods for Determination of Aflatoxin in Peanuts and Peanut Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53 (1) 104-113.

- 13.- Lillard, D.A.; Lantin, R.S. Some Chemical Characteristics and Biological Effects of Photomodified Aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53 (5) 1060-1063.
- 14.- Liem, D.H.; Beljaars, P.R. Note on a Rapid Determination of Aflatoxins on Peanuts and Peanut Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1970, 53 (5) 1064-1066.
- 15.- Stoloff, L.; Nesheim, S.; Yin, L.; Rodricks, J.V.; Stack, M.; Campbell, A.D. A Multimycotoxin Detection Method for Aflatoxins, Ochratoxins, Zearalenone, Sterigmatocystin and Patulin. 1971, 54 (1) 91-97.
- 16.- Stoloff, L. Report on Mycotoxins J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1971, 54 (2) 305-309.
- 17.- Waitking, A.E. Fate of Aflatoxin During Roasting and Storage of Contaminated Peanut Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1971, 54 (3) 533-539.
- 18.- Dantzman, J.; Stoloff, L. Screening Method for Aflatoxin in Corn and Various Corn Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1972, 55 (1) 139-141.
- 19.- Stack, M.E.; Pohland, A.E.; Dantzman, J.G.; Neheim, S.; Derivative Method for Chemical Conformation of Identity of Aflatoxin M₁. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1972, 55 (2) 313-314.
- 20.- Coon, F.B.; Bauer, F.J.; Symmes, L.R.L. International Aflatoxin Chek Sample Program: 1971 Study. 1972, 55 (2) 315-327.
- 21.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L.; Shanm, G.M. Aflatoxins M₁ and M₂ and Parasiticol: Thin Layer Chromatography and Physical and Chemical Properties. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1972, 55 (4) 762-767.
- 22.- Pons, W.A.; Cucullu, A.F.; Franz, A.O. Rapid Quantitative TLC Method for Determining Aflatoxins in Cottonseed Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1972, 55 (4) 768-774.
- 23.- Schoenhard, G.L.; Sinnhuber, R.O.; Lee, D.J. Preparation of ¹⁴C - Labeled Aflatoxin B. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56 (3) 643-646.

- 24.- Pons, W.A.; Cucullu, A.F.; Franz, A.O.; Lee, L.S.; Goldblatt, L.A. Rapid Detection of Aflatoxin Contamination in Agricultural Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56 (4) 803-807.
- 25.- Shotwell, O.L.; Stubblefield, R.D. Collaborative Study of Three Screening Methods for Aflatoxins in Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56 (4) 808-812.
- 26.- Seiber, J.N.; Hsieh, D.P.H.; Application of High-Speed Liquid Chromatography To The Analysis of Aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56 (4) 827-830.
- 27.- Romer, T.R. Determination of Aflatoxins in Mixed Feeds J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56 (5) 1111-1114.
- 28.- Beljaars, P.R.; Verhúlsdonk, C.A.H.; Paulseh, W.E.; Liem, D.H.; Collaborative Study of Two Dimensional Thin Layer Chromatographic Analysis of Aflatoxin B₁ in Peanut Butter Extracts Using The Antidiagonal Spot Application Technique. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1973, 56 (6) 1444-1451.
- 29.- Di Prossimo, U.P. Scale-Up of AOAC Method III for Quantitation and Isolation of Aflatoxins in Nuts and Nut Products for Chemical and Biological Confirmation. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1974, 57 (2) 349-352.
- 30.- Stack, M. E. Collaborative Study of AOAC Methods II and III for The Determination of Aflatoxins in Peanut Butter. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1974, 57 (4) 871-874.
- 31.- Di Prossimo, U.P. Collaborative Study Comparing Two Methods for The Determination of Aflatoxins in Pistachio Nuts. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1974, 57 (5) 1114-1120.
- 32.- Stack, M.E.; Pohland, A.E. Collaborative Study of A Method for Chemical Confirmation of The Identity of Aflatoxin. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1974, 58 (1) 110-113.
- 33.- Thomas F.; Eppley, R.M.; Trucksess, M.W.; Rapid Screening Method for Aflatoxins and Zearalenone in Corn. 1975, 58 (1) 114-116.
- 34.- Stoloff, L. Report on Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975, 58 (2) 213-217.

- 35.- Ashoor, S.H.; Chu, F.S. Reduction of Aflatoxins B1 and B2 with Sodium Borohydride. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975 58 (3) 492-496.
- 36.- Romer, T.R. Screening Method for The Detection of Aflatoxins in Mixed Feeds and Other Agricultural Commodities With Subsequent Confirmation And Quantitative Measurement of Aflatoxins in Positive Samples. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975, 58 (3) 500-506.
- 37.- Ashoor, S.H.; Chu, F.S. New Confirmatory Test for Aflatoxins B 1 and B 2 . J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1975, 58 (3) 617-618.
- 38.- Sphon, J.A.; Dreifuss, P.A.; Schulten, H.R. Field Desorption Mass Spectrometry of Mycotoxins and Mycotoxin Mixtures And Its Application as a Screening Technique for Foodstuffs. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (1) 73-82.
- 39.- Shotwell, O.L.; Goulden, M.L. Aflatoxin: Comparison of Analysis of Corn by Various Methods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (1) 83-88.
- 40.- Stoloff, L. Report On Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (2) 348-353.
- 41.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L. Reverse Phase Analytical and Preparative High Pressure Liquid Chromatography of Aflatoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1977, 60 (4) 784-790.
- 42.- Shotwell, O.L.; Goulden, M.L.; Kwolek, W.F., Aflatoxin in Corn: Evaluation of Filter Fluorometer Reading of Minicolumns. J. Assoc. Off. Anal. Chem.
- 43.- Stoloff, L. Report on Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1978, 61 (2) 340-346.
- 44.- Shotwell, O.L.; Burg, W.R.; Diller, T. Thin Layer Chromatographic Determination of Aflatoxin in Corn Dust. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (5) 1060-1063.
- 45.- Davis, N.D.; Guy, M.L.; Diener, U. L. Improved Fluorometric -Iodin Method for Determination of Aflatoxin in Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (5) 1074-1076.

- 46.- Holaday, C.E.; Shotwell, O.L. Minicolumn Detection Methods for Aflatoxin in Raw Peanuts: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (3) 674-677.
- 47.- Stubblefield, R.D.; Shotwell, O.L. Determination Of Aflatoxins in Animal Tissues. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (4) 964-968.
- 48.- Gregory, J.F. III.; Manley, D. High Performance Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Animal Tissues and Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (1) 144-151.
- 49.- Shantha, T.; Greenivasa, M.V. Use of Sunlight to Partially Detoxify Groundnut (Peanut) Cake Flour and Casein contaminated with Aflatoxin B 1. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1981, 64 (2) 291-293.
- 50.- Friesen, M.D.; Garren, L. International Mycotoxin Check Sample Program: Part I: Report On Laboratory Performance for Determination of Aflatoxins B 1, B 2, G 1 and G 2 in Raw Peanut Meal. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (4) 855-863.
- 51.- Friesen, M.D.; Garren, L. International Mycotoxin Check Sample Program. Part II. Report On Laboratory Performance for Determination of Aflatoxin M 1 in Milk. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (4) 864-868.
- 52.- de Vries, J.W.; Chang, H.L. Comparison of Rapid High Pressure Liquid Chromatography and C.B. Methods for Determination of Aflatoxins in Corn and Peanuts. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (2) 206-209.
- 53.- Hutchins, J.E.; Hagler, W. H. Jr. Rapid Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins in Heavily Contaminated Corn. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (6) 1458-1465.
- 54.- Shannon, G.M.; Shotwell, O.L.; Kwolek, W.F. Extraction and Thin Layer Chromatography of Aflatoxin B 1 in Mixed Feeds. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (3) 582-586.
- 55.- Stoloff, L. Report On Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1983, 66 (2) 355-362.
- 56.- Shepherd, E.C.; Phillips, T.D.; Heidelbaugh, N.D.;

- Mayes, A.W. High Pressure Liquid Chromatographic Determination of Aflatoxins by Using Radial Compression Separation. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1982, 65 (3) 665-671.
- 57.- Scott, P.M. Report on Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (2) 366-368.
- 58.- Tarter, E.J.; Hanchay, J.P.; Scott, P.M. Improved Liquid Chromatographic Method for Determination of Aflatoxins in Peanut Butter and Other Commodities. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (3) 597-600.
- 59.- Chang-Yen, I.; Stoute, V.A.; Felmine, J.B. Effect of Solvent Composition on Aflatoxin Fluorescence. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (2) 306-308.
- 60.- Campbell, A.D.; Francis, O.J.; Beebe, P.A.; Stoloff, L. Determination of Aflatoxins in Peanut Butter, Using Two Liquid Chromatographic Methods: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (2) 312-316.
- 61.- Park, D.L. Negative Ion Chemical Ionization Mass Spectrometric Method for Confirmation of Identity of Aflatoxin B₁: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985, 68 (4) 636-639.
- 62.- Framy, J.M.; Chu, F.S. Direct ELISA for Determining Aflatoxin B₁ at picogram levels in Dairy Products. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984, 67 (6) 1098-1101.
- 63.- Scott, P.M. Report on Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985, 68 (2) 242-248.
- 64.- Morad, M.M.; Choto, C.E.; Rooney, L.W. The Quality of Tortillas Containing Whole Sorghum and Pearled Sorghum Alone and Blended With Yellow Maize. Cereal Chem. 1985, 62 (1) 51-54.
- 65.- Davis, N.D.; Currier, C.G.; Diener, U.L. Aflatoxin Contamination of Corn Hybrids in Alabama. Cereal Chem. 1986, 63 (6) 467-470.
- 66.- Scott, P.M. Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1986, 69 (2) 240-245.
- 67.- Spilmann, J.R. Jr. Modification of The Rapid Screening Method for Aflatoxin in Corn for Quantitative Use. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1985, 68 (3) 453-455.

- 68.- Ram, B.P.; Hart, P.L.; Shotwell, O.L.; Pestka, J.J. ELISA of Aflatoxina B 1 in Naturally Contaminated Corn and Cottonseed. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1986, 69 (5) 904-907.
- 69.- Chu, S.F.; Fan, T.S.L.; Zhang, G.S. Improve ELISA for Aflatoxin B 1 in Agricultural Commodities. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1987, 70 (5) 854-857.
- 70.- Scott, P.M. Mycotoxins. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72 (1) 75-80.
- 71.- Park, D.L.; Miller, B.M.; Hart, P.; Yang, G.; Mc Vey, J.; Page, S.W.; Pestka, J.; Brown, L.M. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Screening Aflatoxin B 1 in Cottonseed Products and Mixed Feed: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1989, 72 (1) 326-331.
- 72.- Chu, F.S.; Lee, R.C.; Trucksess, M.W.; Park, D.L. Evaluation by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay of Cleanup for TLC of Aflatoxin B 1 in Corn, Peanuts, and Peanut Butter. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1988, 71 (5) 953-956.
- 73.- Schroeder, T.; Zweifel, U.; Sagelsdorff, P.; Friederich, U.; Luthy, J.; Schlatter, C. Ammoniation of Aflatoxin-Containing Corn: Distribution, in vivo Covalent Deoxyribonucleic Acid Binding and Mutagenicity of Ration Products. J. Agric. Food Chem. 1985, (33) 311-316.
- 74.- Dutton, M.F. Enzymes and Aflatoxin Biosynthesis, Microbiol. Rev. 1988, 52, 274-295.
- 75.- Lee, L.S. Aflatoxin. New Approaches to Research at The SRRC; a Discussion of Analytical Instrumentation; and Perspectives on the Recent Toughening of Permissible Levels in European Imports. J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989, 66 (10) 1398-1402.
- 76.- U.K. Ministry of Agriculture, Fisheries and Food. European Perspective on aflatoxin. J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989, 66 (10) 1408-1409.
- 77.- Cappuccio, M. Effects of New Rules on EEC Trade. J. Amer. Oil Chem. Soc. 1989, 66 (10) 1410-1413.
- 78.- Fernández-Alonso, M.; Rebolledo-Castillo, R. Determinación

de Aflatoxinas en Maiz por Cromatografía de Líquidos de Alta Presión. Memorias del IV Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1985, UANL Monterrey, N.L. 262-263.

- 79.- Fernández-Alonso M.; Acuña-Askar, K. Determinación de Aflatoxinas en Alimentos Balanceados Mediante Extracción en Fase Sólida y Cuantificación por Cromatografía de Líquidos. Memorias del VI Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1988, UANL Monterrey, N.L. 9
- 80.- Fernández-Alonso, M.; Acuña-Askar, K. Evaluación de Fases Sólidas Estacionarias Utilizadas en la Limpieza y Extracción de Aflatoxinas Procedentes de Muestras Alimenticias. Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1989, UANL Monterrey, N.L. 113.
- 81.- Fernández-Alonso, M.; Heyer-Rodríguez, L.; Acuña-Askar, K. Determinación por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia de Aflatoxinas en Maiz y Alimentos Balanceados. Memorias del VII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1989, UANL Monterrey, N.L. 260.
- 82.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Evaluación de Parámetros Cromatográficos del Empaque Micropak MCH-5 Para su Uso en el Análisis de Aflatoxinas. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 289.
- 83.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Comparación de los Límites de Detección de Aflatoxinas en Muestras de Maiz, Cacahuete y Nuez Detectadas por Fluorescencia Molecular con Previa Separación Cromatográfica. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 378.
- 84.- Acuña-Askar, K.; Fernández-Alonso, M. Torres de-Navarro, E. Aflatoxinas en Sorgo: Su Extracción en Fase Inversa y Su Análisis por Cromatografía de Alta Resolución. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 377.
- 85.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Heyer-Rodríguez, L. Acuña-Askar, K. Desarrollo de un Método Analítico Para la Determinación de Aflatoxinas en Muestras de Cacahuete por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución y Detección por Fluorescencia Molecular. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 267.

- 86.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Análisis de Aflatoxinas en Cáscara de Algodón por CLAR. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 270.
- 87.- Borrego-López, C.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Acuña-Askar, K. Análisis de Aflatoxinas en Muestras de Maíz de la Región Norte de México. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 268.
- 88.- Martínez-Burnes, J.; Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E. Acuña-Askar, K. Análisis de Aflatoxinas en Muestras de Maíz Procedentes de la Región Noreste de México. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL. Monterrey, N.L. 269.
- 89.- Fernández-Alonso, M.; Torres de-Navarro, E.; Acuña-Askar, K. Castellón Santa-Anna, J.P. Aflatoxinas en Harina de Maíz Nixtamalizado Para Hacer Tortillas: Su Análisis por Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Memorias del VIII Encuentro Regional de Investigación Biomédica. 1990, UANL Monterrey, N.L. 226.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CAPITULO 5

APENDICE A

GLOSARIO

- ANOREXIA.** Falta de apetito.
- ATAXIA.** Falta o irregularidad de la coordinación, especialmente de los movimientos musculares sin debilidad o espasmo de éstos.
- CANCER.** Tumor maligno en general y especialmente el formado por células epiteliales.
- CIRROSIS.** Inflamación intersticial de un órgano, particularmente el hígado.
- COLANGIOMA.** Tumor de las vías biliares.
- COLANGITIS.** Inflamación de los conductos biliares.
- EDEMA PULMONAR.** Infiltración de serosidad en el tejido pulmonar con expectoración espumosa rosada, hipotensión acusada y asistolia aguda.
-
- FIBROSIS.** Formación de tejido fibroso. Degeneración fibroide.
- GLOMERULO RENAL.** Apelotonamiento de capilares arteriales en el extremo dilatado de cada tubo urinífero.
- HEPATITIS.** Inflamación del hígado.
- HEPATOCITO.** Célula del hígado.
- HEPATOMA.** Tumor del hígado.
- HEPATOMEGALIA.** Aumento de volumen del hígado.
- HEPATOTOXICO.** Agente venenoso al hígado.
- HIPERPLASIA.** Hipergénesis. Multiplicación anormal de los elementos histicos; hipertrofia numérica.

- LETARGO.** Sueño morbosos profundo y continuado con anestesia y exaltación de los reflejos.
- METASTASIS.** Aparición de unos o más focos morbosos secundarios a otro primitivo, con o sin desaparición de éste, en regiones o partes no contiguas al foco primitivo.
- MICROSOMA.** Elemento granuloso muy pequeño del protoplasma celular.
- NECROSIS.** Mortificación de un tejido en general, gangrena. La parte necrosada se llama secuestro.
- NECROSIS DIFUSA.** Necrosis ampliamente extendida.
- NEFRITIS.** Inflamación del tejido renal.
- NEFRITIS GLOMERULAR.** La nefritis aguda que afecta primordialmente los glomérulos o éstos y las cápsulas de Bowman.
- NODULO.** Pequeña eminencia, nudosidad o vegetación.
- PARENQUIMA.** Elemento esencial específico o funcional de un órgano, generalmente glandular.
- PROTROMBINA.** Trombinógeno. Factor del plasma sanguíneo, precursor de la trombina, llamado también serocima y trombógeno.
- TENESMO.** Deseo continuo, doloroso e ineficaz de orinar o defecar producido por un estado irritativo del cuello vesical o del ano o recto.
- TERATOMA.** Tumor complejo de tejido que contiene a veces restos fetales, dientes, cabellos, etc., debido a la inclusión de un feto abortivo en otro que se desarrolla normalmente.
- VENA PORTA.** Sistema venoso especial constituido por ramas de origen, tronco y ramos venosos terminales. Se origina de la unión de la vena esplénica con las mesentéricas a nivel de la cabeza del páncreas. Termina en el hígado por dos ramas, derecha e izquierda, que se distribuyen a modo de las arterias.

A P E N D I C E B

METODOLOGIA DE ANALISIS USANDO ESTANDAR INTERNO COMO UN METODO PARA OBTENER MAYOR PRECISION EN ANALISIS POR HPLC.

Conociendo en forma aproximada la concentración del analito, se podrían preparar tres estándares: el primero de ellos 10 % menor a la concentración del analito, el segundo a la concentración más aproximada de éste, y el tercero 10 % mayor.

Si los cromatogramas se hicieran con un registrador y no un integrador y el método se hiciera sólo en base a alturas, se podría hacer lo siguiente:

Sea:

H St In : altura del estándar interno.

H St : altura del estándar.

At St In: atenuación del registrador a la que se obtuvo la altura del estándar interno.

At St : Atenuación del registrador a la que se obtuvo la altura del estándar.

Hc : Relación de altura corregida.

Hc₁* : Promedio de las alturas corregidas para el estándar de menor concentración.

Hc₂* : Promedio de las alturas corregidas para el estándar de mediana concentración.

Hc₃* : Promedio de las alturas corregidas para el estándar de mayor concentración.

[St₁] : Concentración del primer estándar usada para obtener el factor de respuesta del primer estándar.

[St₂] : Concentración del segundo estándar usada para obtener el factor de respuesta del segundo estándar.

[St₃] : Concentración del tercer estándar usada para obtener el factor de respuesta del tercer estándar.

D₁ : Factor de respuesta del primer estándar.

D₂ : Factor de respuesta del segundo estándar.

D₃ : Factor de respuesta del tercer estándar.

D* : Factor de respuesta promedio en el rango de concentraciones.

Hc_{at}* : Altura corregida promedio para el analito.

S : Masa (por lo general gramos) de la muestra en la cual el analito se desea determinar.

100 : Factor de conversión al porcentaje en el cual, el analito se encuentra en la muestra.

Cálculos para obtener los promedios de alturas corregidas, considerando que cada estándar se hiciese por triplicado.

$$\begin{aligned}
 \text{1er. St.} &: \frac{H \text{ St.}_1}{H \text{ St In.}_1} \times \frac{At \text{ St.}_1}{At \text{ St In.}_1} = HC_1 \\
 &+ \\
 &: \frac{H \text{ St}'_1}{H \text{ St In}'_1} \times \frac{At \text{ St}'_1}{At \text{ St In}'_1} = HC'_1 \\
 &+ \\
 &: \frac{H \text{ St}''_1}{H \text{ St In}''_1} \times \frac{At \text{ St}''_1}{At \text{ St In}''_1} = HC''_1 \\
 &\hline
 &HC*_1
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{2o. St.} &: \frac{H \text{ St.}_2}{H \text{ St In.}_2} \times \frac{At \text{ St.}_2}{At \text{ St In.}_2} = HC_2 \\
 &+ \\
 &: \frac{H \text{ St}'_2}{H \text{ St In}'_2} \times \frac{At \text{ St}'_2}{At \text{ St In}'_2} = HC'_2 \\
 &+ \\
 &: \frac{H \text{ St}''_2}{H \text{ St In}''_2} \times \frac{At \text{ St}''_2}{At \text{ St In}''_2} = HC''_2 \\
 &\hline
 &HC*_2
 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned}
 \text{3er. St.} &: \frac{H \text{ St.}_3}{H \text{ St In.}_3} \times \frac{At \text{ St.}_3}{At \text{ St In.}_3} = HC_3 \\
 &+ \\
 &: \frac{H \text{ St}'_3}{H \text{ St In}'_3} \times \frac{At \text{ St}'_3}{At \text{ St In}'_3} = HC'_3 \\
 &+ \\
 &: \frac{H \text{ St}''_3}{H \text{ St In}''_3} \times \frac{At \text{ St}''_3}{At \text{ St In}''_3} = HC''_3 \\
 &\hline
 &HC*_3
 \end{aligned}$$

Cálculos para encontrar el factor de respuesta promedio:

$$\text{1er St: } \frac{[St_1]}{HC*_1} = D_1$$

+

$$\text{2o. St: } \frac{[St_2]}{HC*_2} = D_2$$

+

$$\text{3er St: } \frac{[St_3]}{HC*_3} = D_3$$

D*

Para calcular la concentración del analito a partir de las muestras:

$$(D^*) (HCa^*) / S \times 100 = \% \text{ en la muestra.}$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A P E N D I C E C

EVALUACION DE PARAMETROS CROMATOGRAFICOS DEL EMPAQUE MICROPAK MCH-5 PARA SU USO EN EL ANALISIS DE AFLATOXINAS.

La selección apropiada de las columnas analíticas para uso en HPLC depende de una serie de parámetros cromatográficos que están en función de la fase estacionaria, la fase móvil y de la naturaleza de los solutos.

Las condiciones de trabajo fueron las mismas que han sido reportadas en la sección de metodología de esta investigación.

Los resultados mostraron lo siguiente:

AFLATOXINA	k'	K	N	H (cm)
G 1 *	5.6	2.2	4624	6.5×10^{-3}
B 1 *	9.0	3.6	2410	1.2×10^{-2}
G 2	16.3	6.5	11856	2.5×10^{-3}
B 2	25.3	10.1	36100	8.3×10^{-4}

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

AFLATOXINAS	ALFA	Rs.
G 1* - B 1*	1.6	6.2
B 1* - G 2	1.8	11.0
G 2 - B 2	1.5	15.8

* Derivatizada.

Donde: k': Factor de capacidad. Alfa: Factor de selectividad.
 K : Coeficiente de Rs: Resolución.
 partición.
 N: Número efectivo de platos teóricos.
 H: Altura equivalente a un plato teórico.

A P E N D I C E D

VERSION EN ESPAÑOL DE LAS CONDICIONES DE SEGURIDAD SUGERIDAS POR EL FABRICANTE (SIGMA) PARA EL MANEJO DE LAS AFLATOXINAS.

La bibliografía en la que se basan las recomendaciones aparece al final de ellas.

A. Peligrosidad.

Las toxinas fungales usadas en esta investigación son extremadamente peligrosas por ingestión, inhalación o absorción por piel (1,2,3).

B. Manejo.

Estos compuestos debieran ser manejados en sistemas cerrados. Todas las operaciones debieran llevarse a cabo con guantes para evitar contacto accidental. Todo trabajador debiera vestir en su totalidad con ropa desechable, incluyendo cubiertas para zapatos, guantes y máscara con un aprovisionamiento independiente de aire. En todo momento se debe recordar que la ingestión, absorción por piel o inyección o aún una cantidad traza podría ser fatal.

C).Descontaminación y desecho.

Dualquier derrame debiera ser absorbido con tierra de diatomeas, cuidadosamente colectado y localizado en un balde. El área después se limpia cuidadosamente.

El sistema hipoclorito de sodio/acetona ha sido empleado exitosamente como un método de destrucción (4,5).

Al material que se va a descontaminar se le adiciona solución de hipoclorito al 5 % por volumen y se le mantiene cubierto en esa postura por 30 minutos. El pH de la solución se ajusta a 7.8 u 8.0 por la adición en gota de HCl 2 N seguido por la adición de acetona hasta que la concentración de acetona en la solución es de 5 % por volumen. Esta mezcla se deja descansar cubierta por otros 30

minutos después de los cuales, lo carcinógeno debió haberse convertido al derivado dihidroxi que no es carcinogénico (5). Revisar que la reacción se haya llevado a cabo completamente mediante el depósito de gotas sobre papel filtro y examinándolas después de haberse secado, bajo luz ultravioleta. Las manchas no debieran ser fluorescentes.

Deseche el material contaminado de acuerdo a regulaciones locales.

NOTAS.

1. El pH de las soluciones de hipoclorito de sodio comercial es alrededor de 11.5 y el descenso de su pH a 7.4 mediante la adición de ácido puede conducir a la emisión de cloro. O de otra manera, la adición de acetona a una solución fuerte de hipoclorito de sodio puede conducir a una reacción violenta de haloformo (5).

2. Castegnaro, et al. (5) indican que la detoxificación de la aflatoxina B 1 con hipoclorito de sodio conduce a la formación de productos que incluye el carcinogénico y mutagénico 2,3-dicloro-derivado. También se hace notar que el hipoclorito de sodio podría reaccionar con otros componentes de los residuos.

A la luz de esta información, SIGMA recomienda que se duplique la cantidad de hipoclorito (sobre la cantidad estimada como necesaria) para asegurar la degradación efectiva de los residuos de las aflatoxinas.

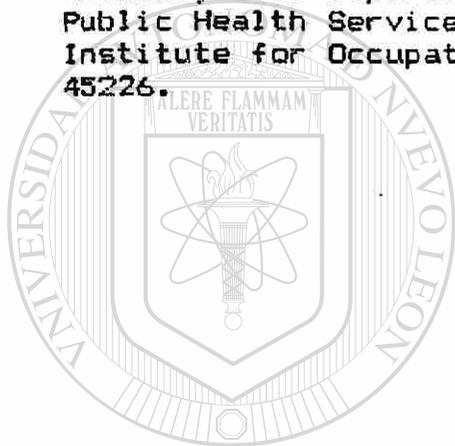
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

D).EXPOSICION. En caso de derrame accidental o exposición, láve con agua y jabón y obtenga auxilio médico de inmediato. Informe al médico de la toxina que se estuvo manejando. ®

Bibliografía de las recomendaciones.

1. Ceigler, A., et al. (Eds.) Microbial toxins. Vol VI y VII. Academic Press. N.Y.
2. Rodrick, J.V., et al. (Eds.) Mycotoxins Human and Animal Health Proceedings Conference 1977. Pathotox Publisher. Park Forest South, IL.

3. International Agency for Research on Cancer Monographs. Vol I 1972, Vol 10 1975.
4. IARC Scientific Publication No. 37 p. 9, 1980. Laboratory Decontamination and Destruction of Aflatoxins B 1, B 2, G 1 G 2 in Laboratory Wastes. International Agency for Research on Cancer, 1979, 150 cours Albert-Thomas, 69372 Lyon Cedex 2, France.
5. Castegnaro, M., Friesen, M., Michelon, J., Waler, E.A., American Industrial Hygiene Association 42, pp. 398-401 1981.
6. January, 1981 Registry of Toxic Effects of Chemical Substances (RTECS), U.S. Department of Health, Education and Welfare. Public Health Service. Center for disease Control. National Institute for Occupational Safety and Health, Cincinnati, OH 45226.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

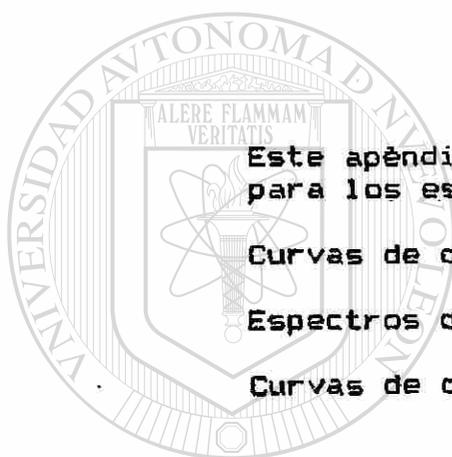
APÉNDICE E

Este apéndice contiene en el siguiente orden,
para los estándares de aflatoxinas:

Curvas de calibración por fluorescencia directa.

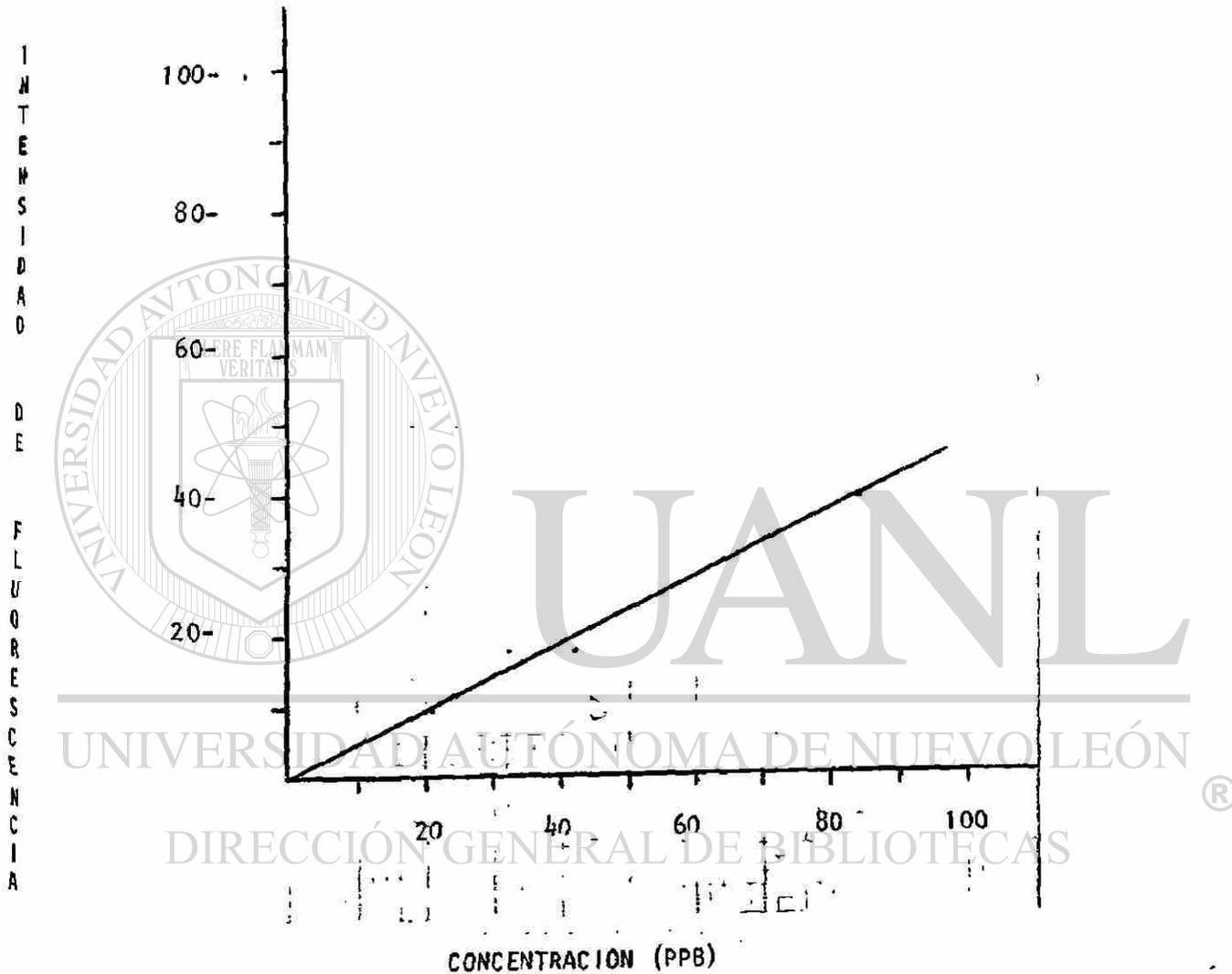
Espectros de fluorescencia.

Curvas de calibración por ultravioleta directa.



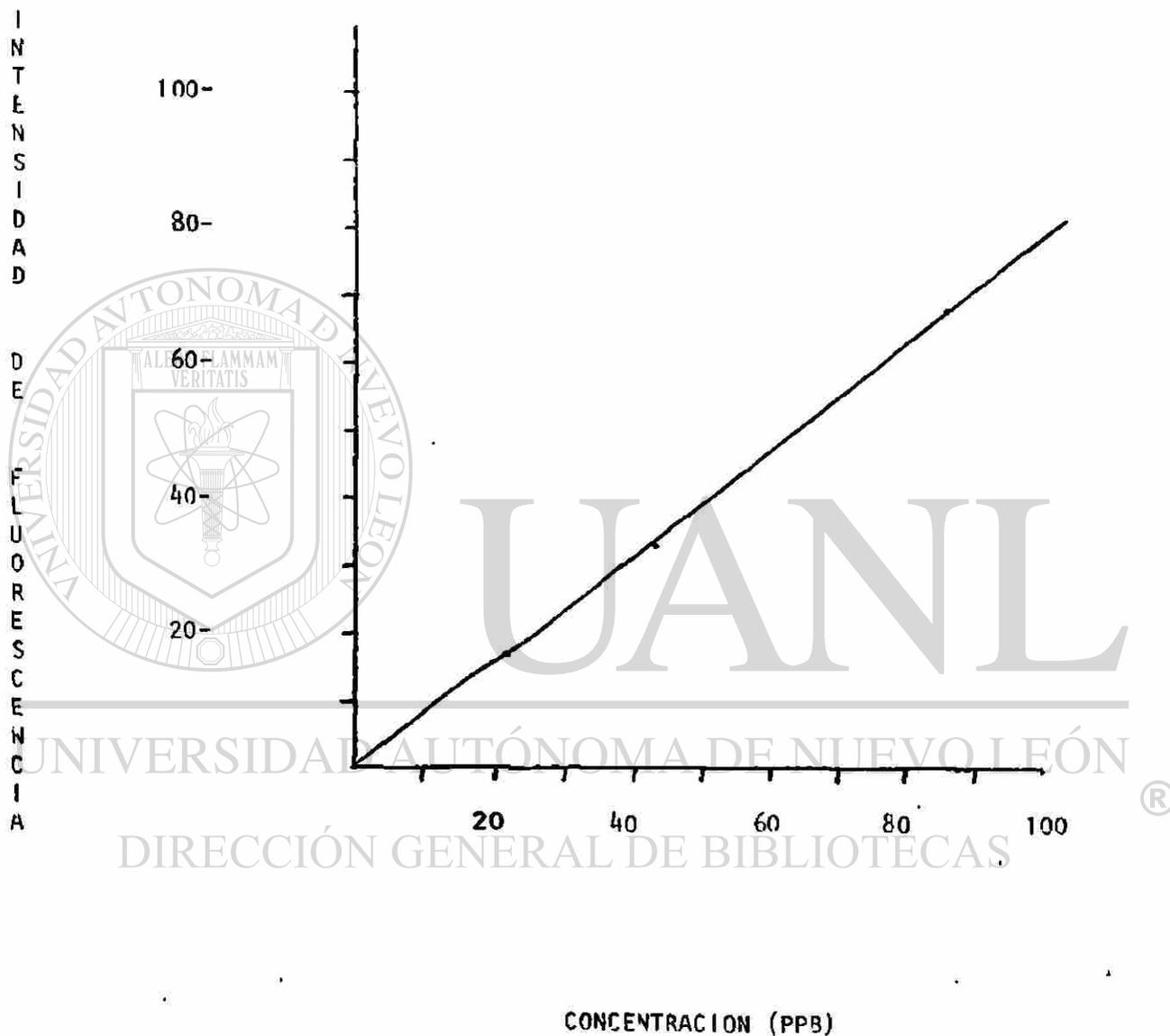
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



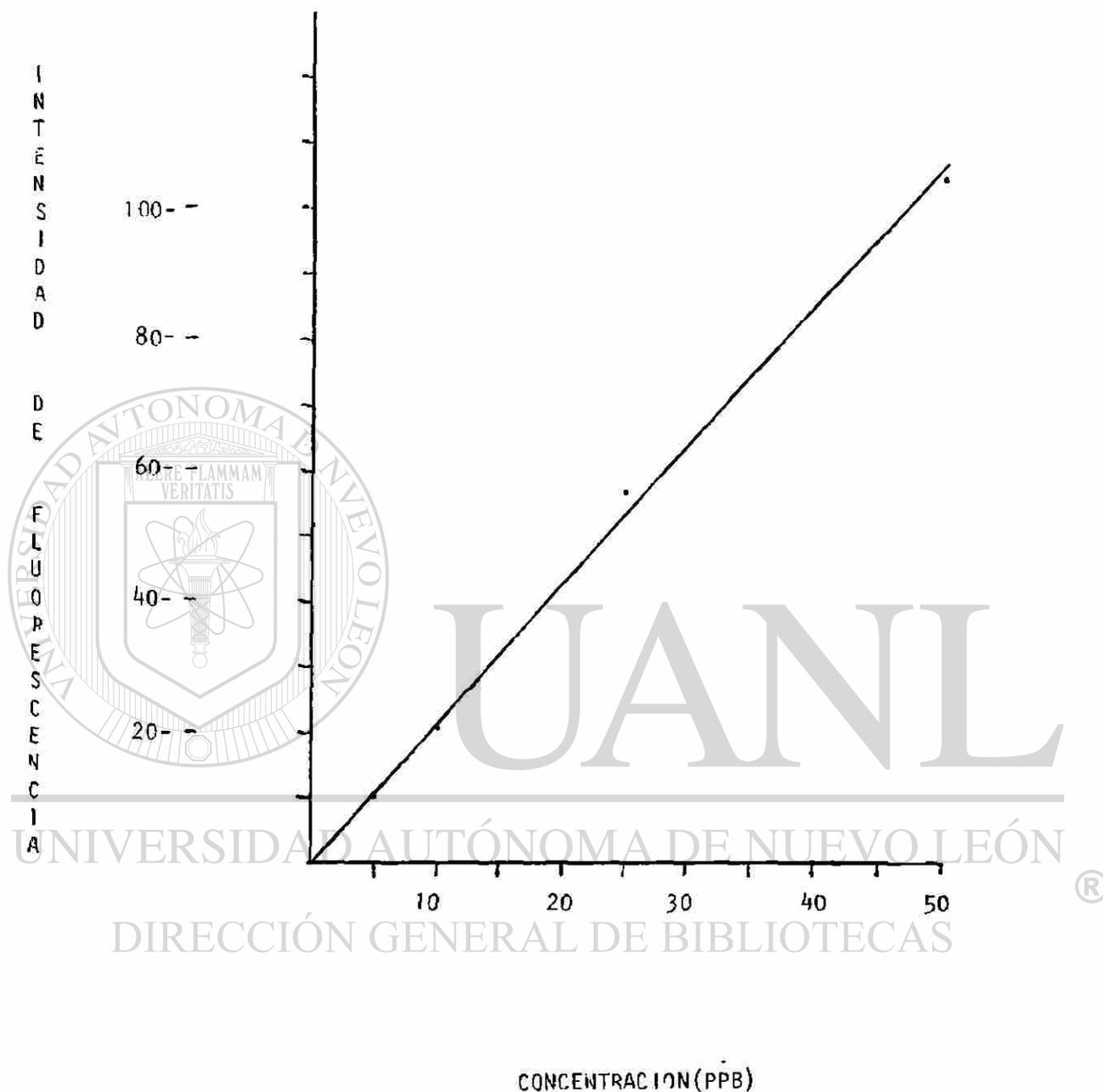
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B1 NO DERIVATIZADA.
 DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
 SENSIBILIDAD : 100 X 10
 METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. 1



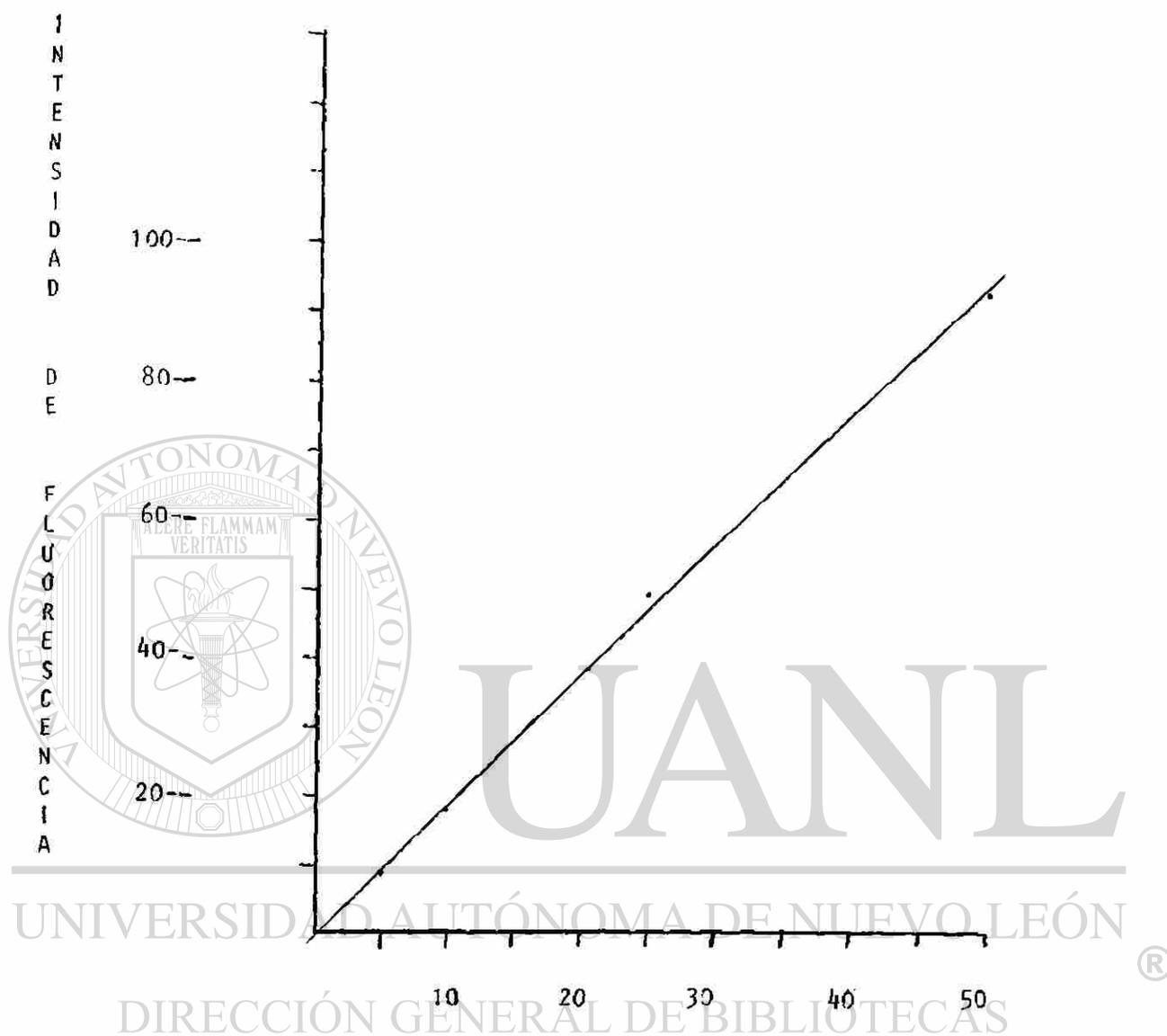
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G1 NO DERIVATIZADA.
 DETECTOR : FLUORESCENCIA PMQ3
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
 SENSIBILIDAD : 100 X 10
 METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. 11



CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B1 DERIVATIZADA
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
LAMBDA : EXCITACION 365 NM
EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

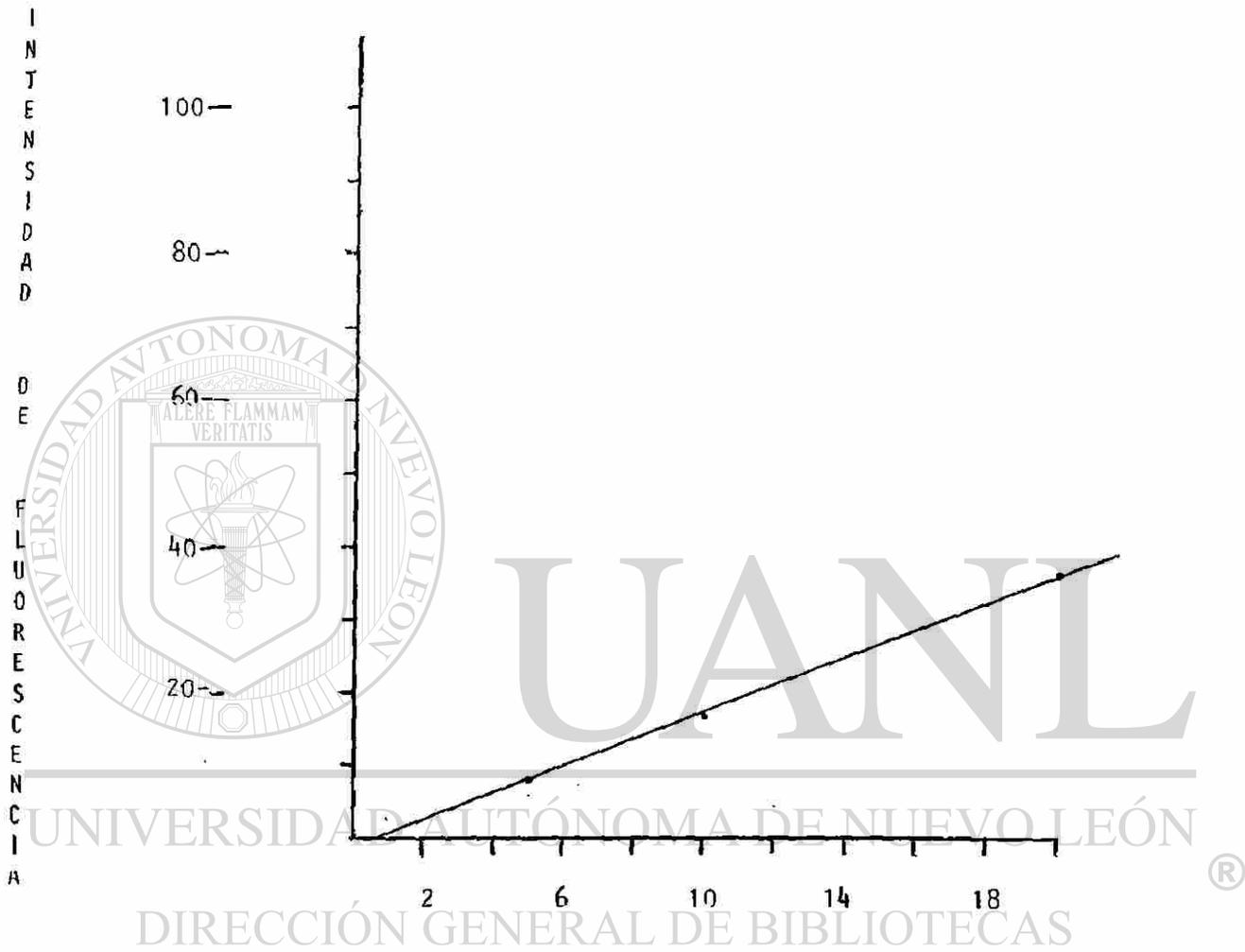
FIG. III



CONCENTRACION (PPB)

CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G1 DERIVATIZADA
 DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PMQ3
 LAMBDA : EXCITACION 365 NM
 EMISION : 436 NM.
 SENSIBILIDAD : 100 X 10
 METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. IV



CONCENTRACION (PPB)

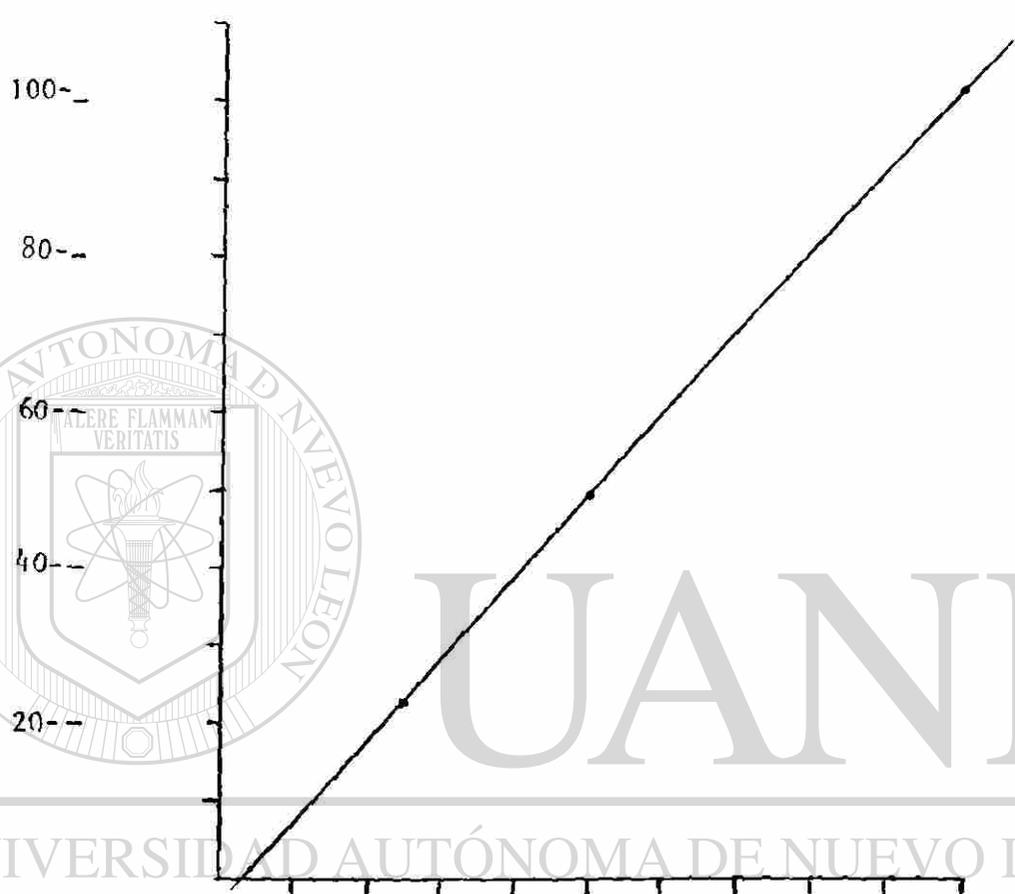
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G2
 DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
 SENSIBILIDAD : 100 X 10
 METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. V

I
N
T
E
N
S
I
D
A
D
O

D
E

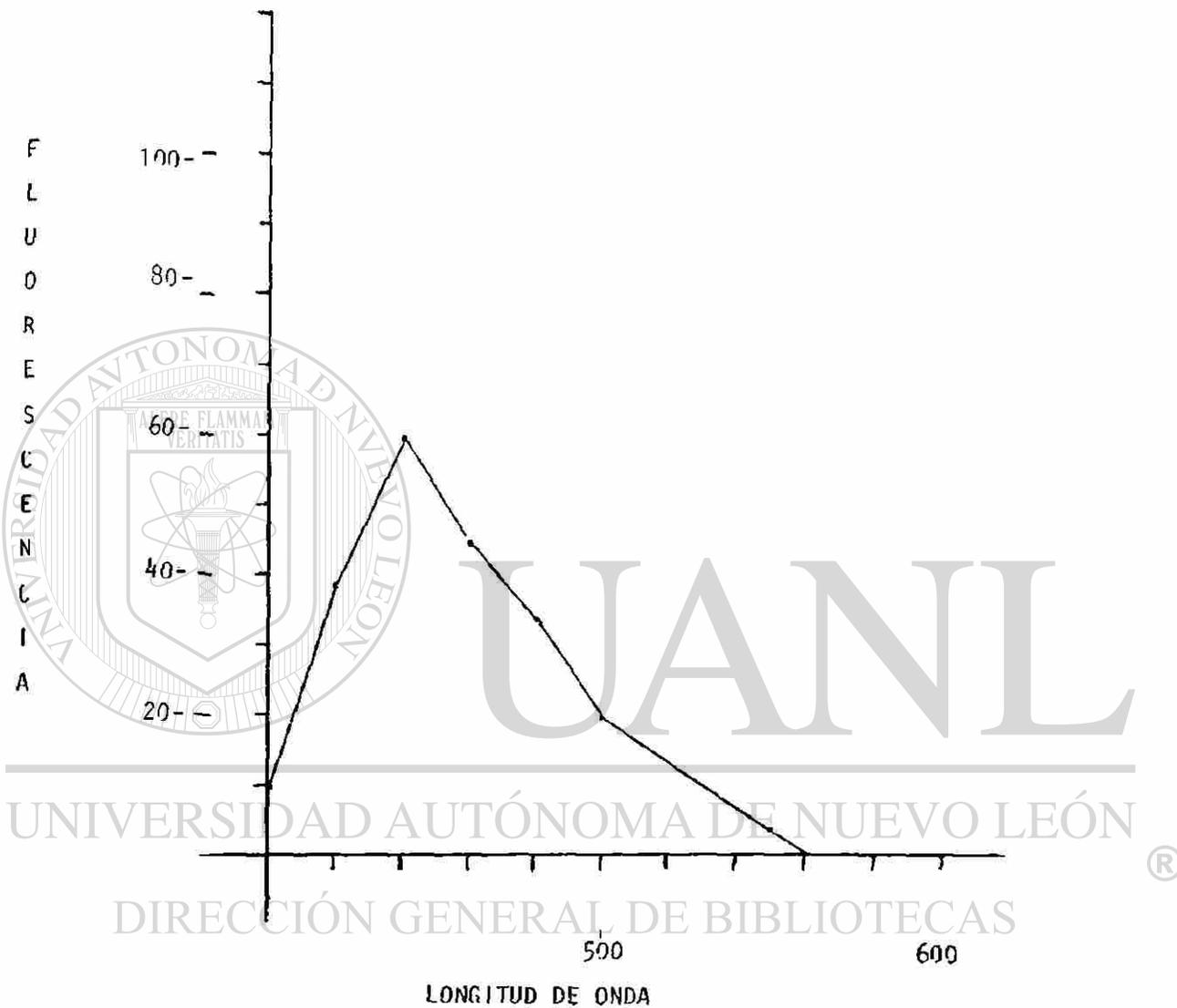
F
L
U
O
R
E
S
C
E
N
C
I
A



CONCENTRACION (PPB)

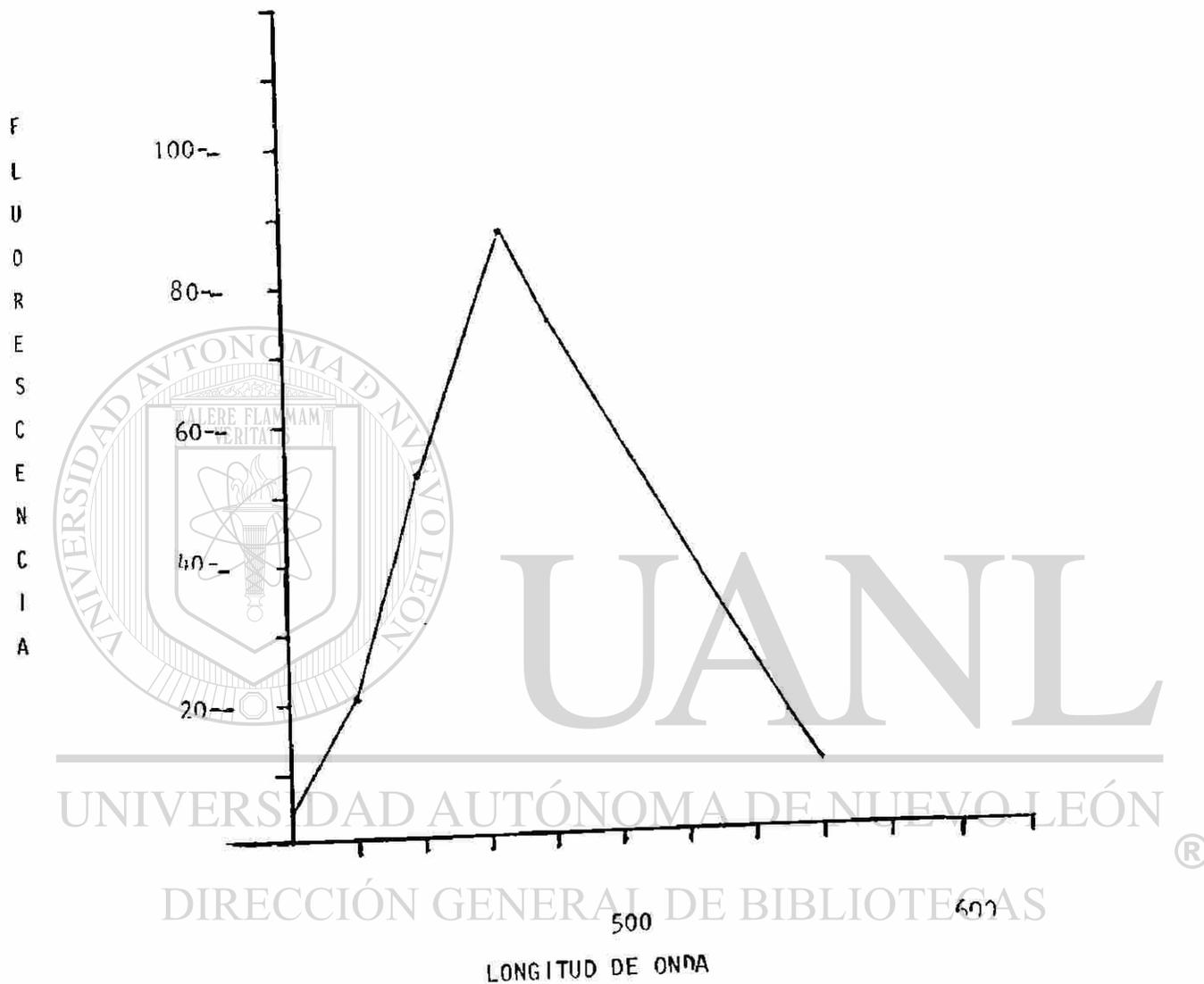
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B2
DETECTOR : FLUORESCENCIA KARL ZEISS PM03
LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : 436 NM
SENSIBILIDAD : 100 X 10
METODO DE LECTURA : DIRECTO

FIG. VI



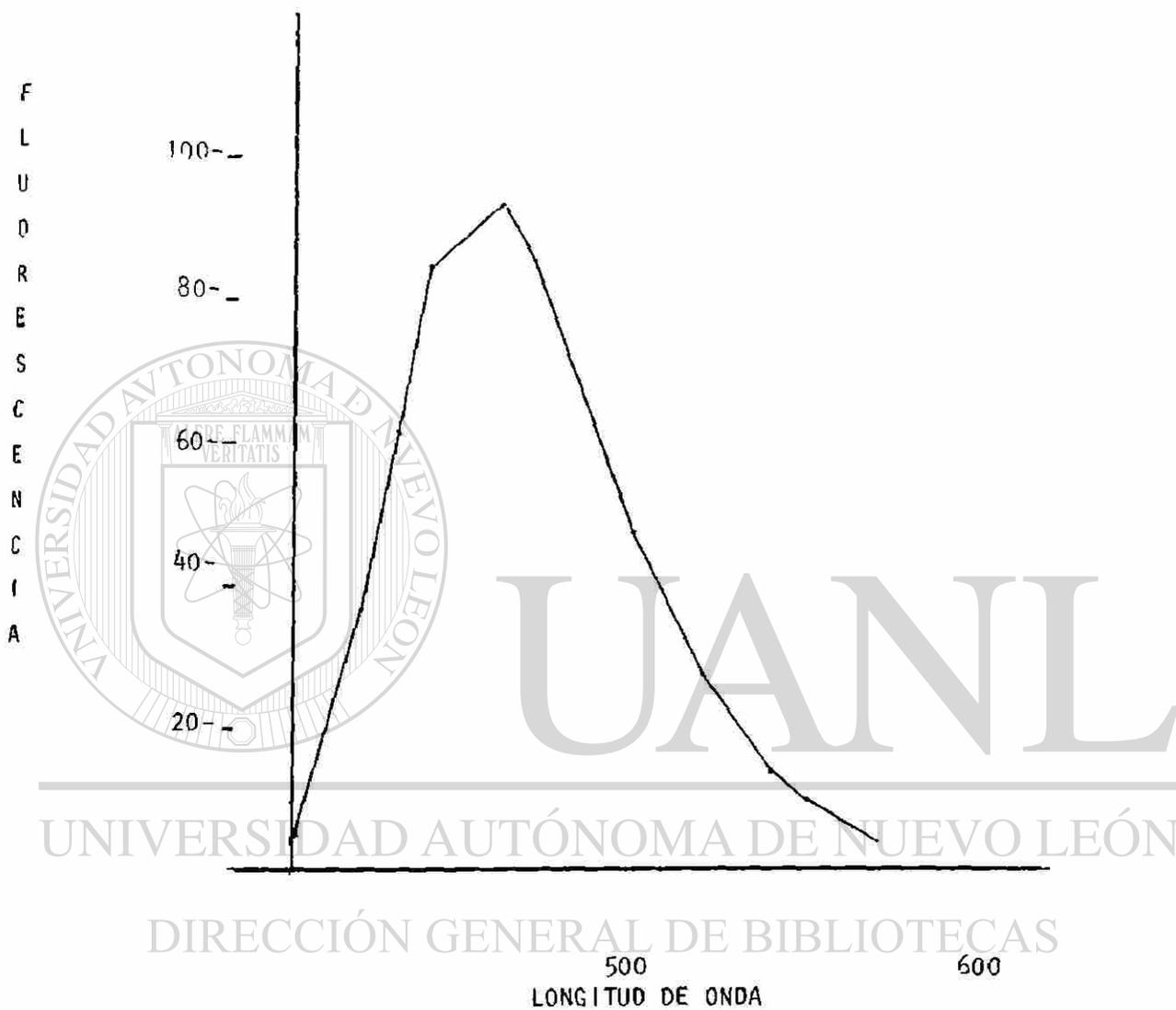
ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE B1 DERIVATIZADA
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : VARIABLE
 DETECTOR : KARL ZEISS : PMQ3
 SENSIBILIDAD : 100 X 10 SLIT 0.5
 LAMBDA MAX. EMIS. 440 NM

FIG.VII



ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE G1 DERIVATIZADA
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : VARIABLE
 DETECTOR : KARL ZEISS PMQ 3
 SENSIBILIDAD : 100 X 10 SLIT. 0.5
 LAMBDA : MAX. EMISION : 466 NM

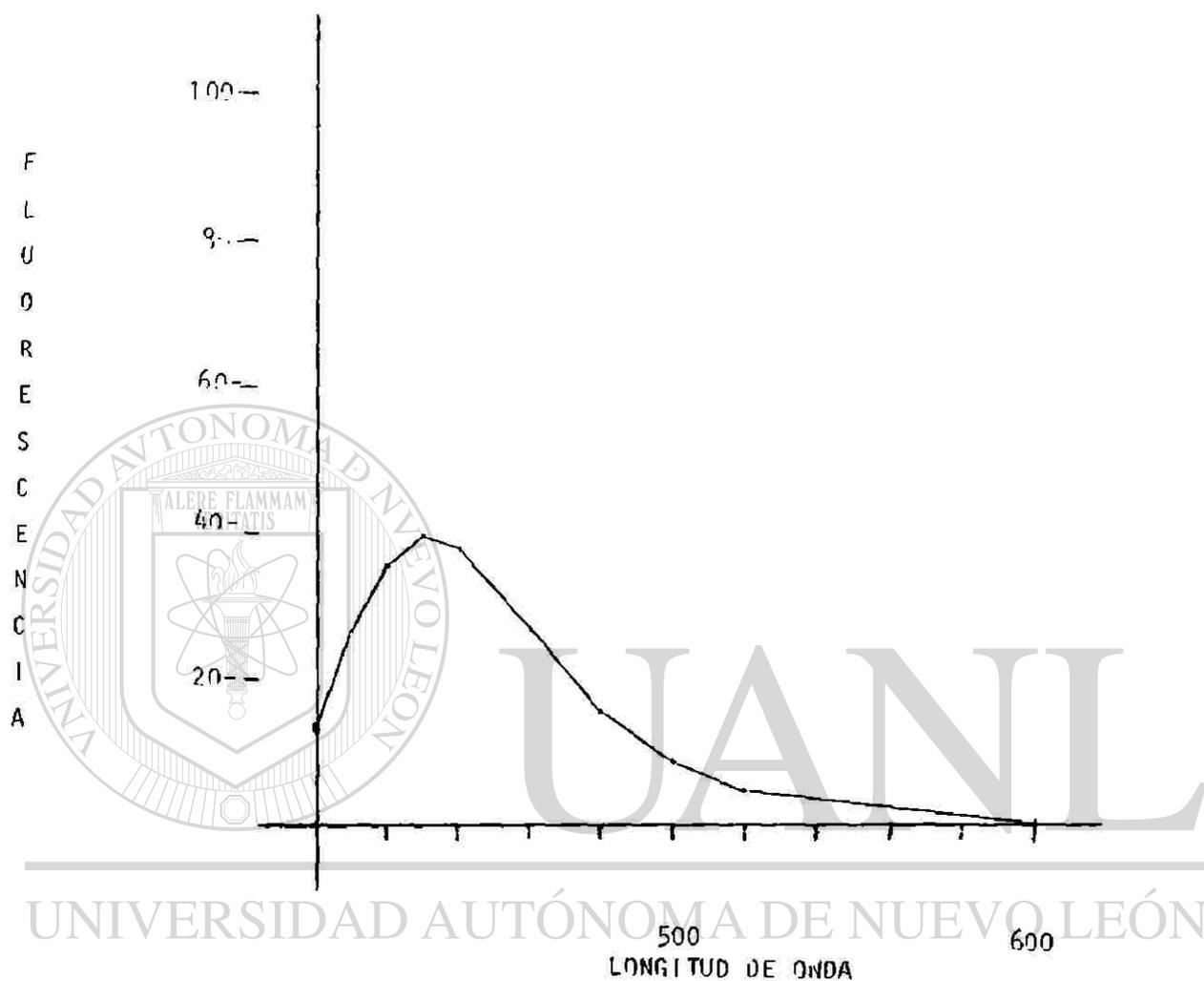
FIG. VIII



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE G2
 LAMBDA : EXCITACION : 365 NM
 EMISION : VARIABLE
 DETECTOR : KARL ZEISS PMQ3
 SENSIBILIDAD : 100 X 6 SLIT 0.3
 LAMBDA : MAX. EMIS. : 456

FIG. IX



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

ESPECTRO DE FLUORESCENCIA DE B2

LAMBDA : EXCITACION : 365 NM

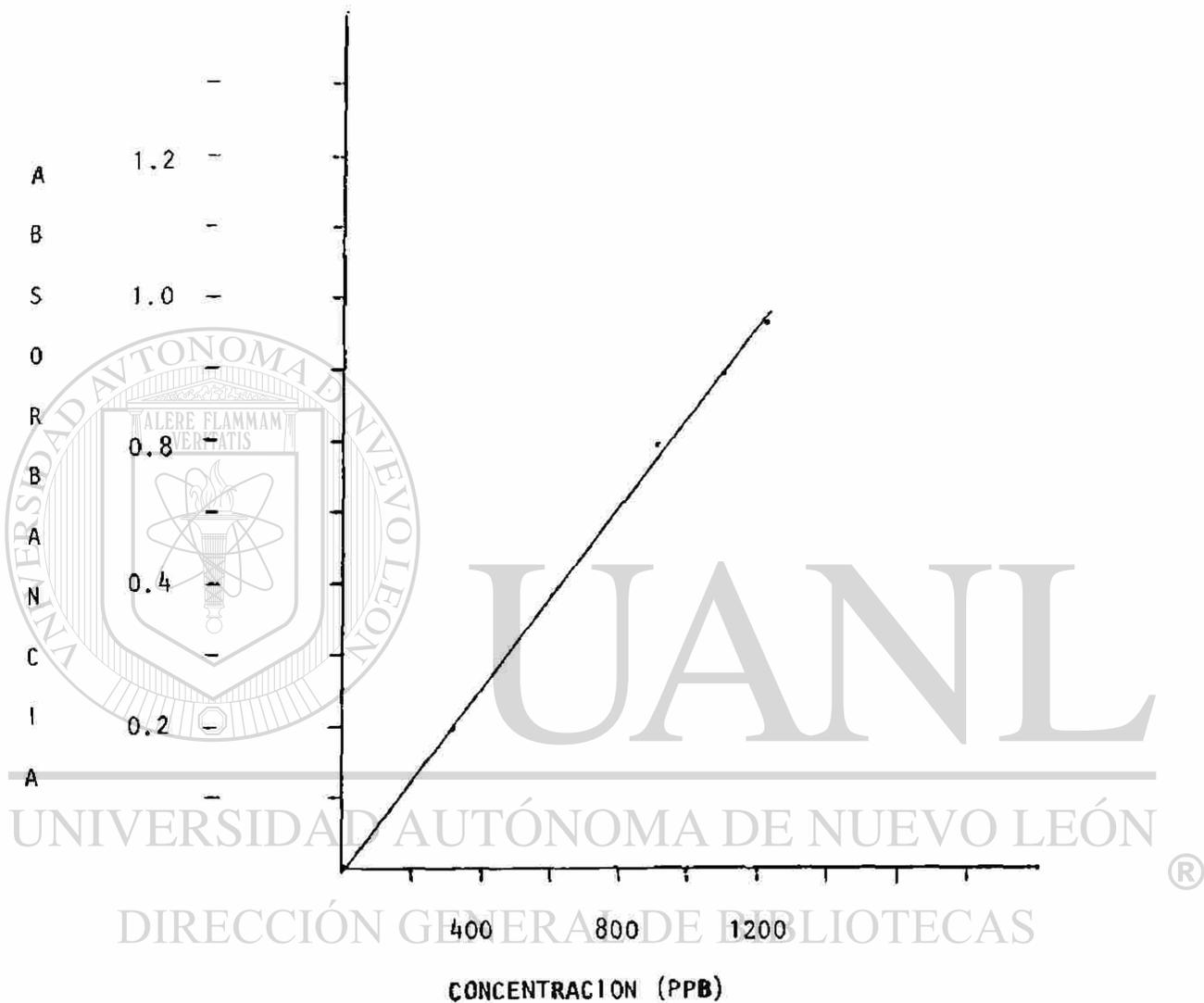
EMISION : VARIABLE

DETECTOR : KARL ZEISS PMQ3

SENSIBILIDAD : 100 X 6 SLIT 0.3

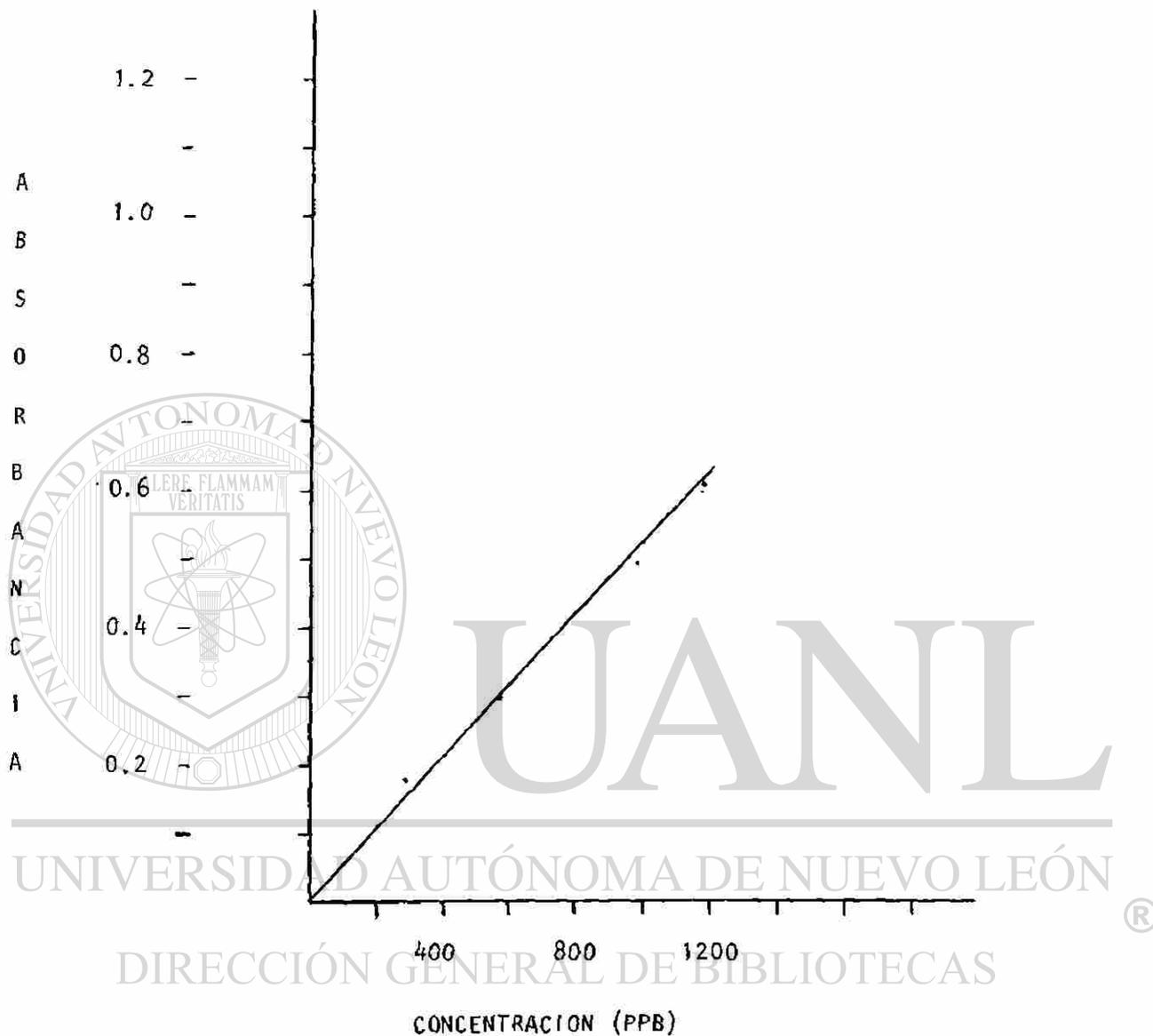
LAMBDA MAX. EMISION : 432 NM

FIG. X



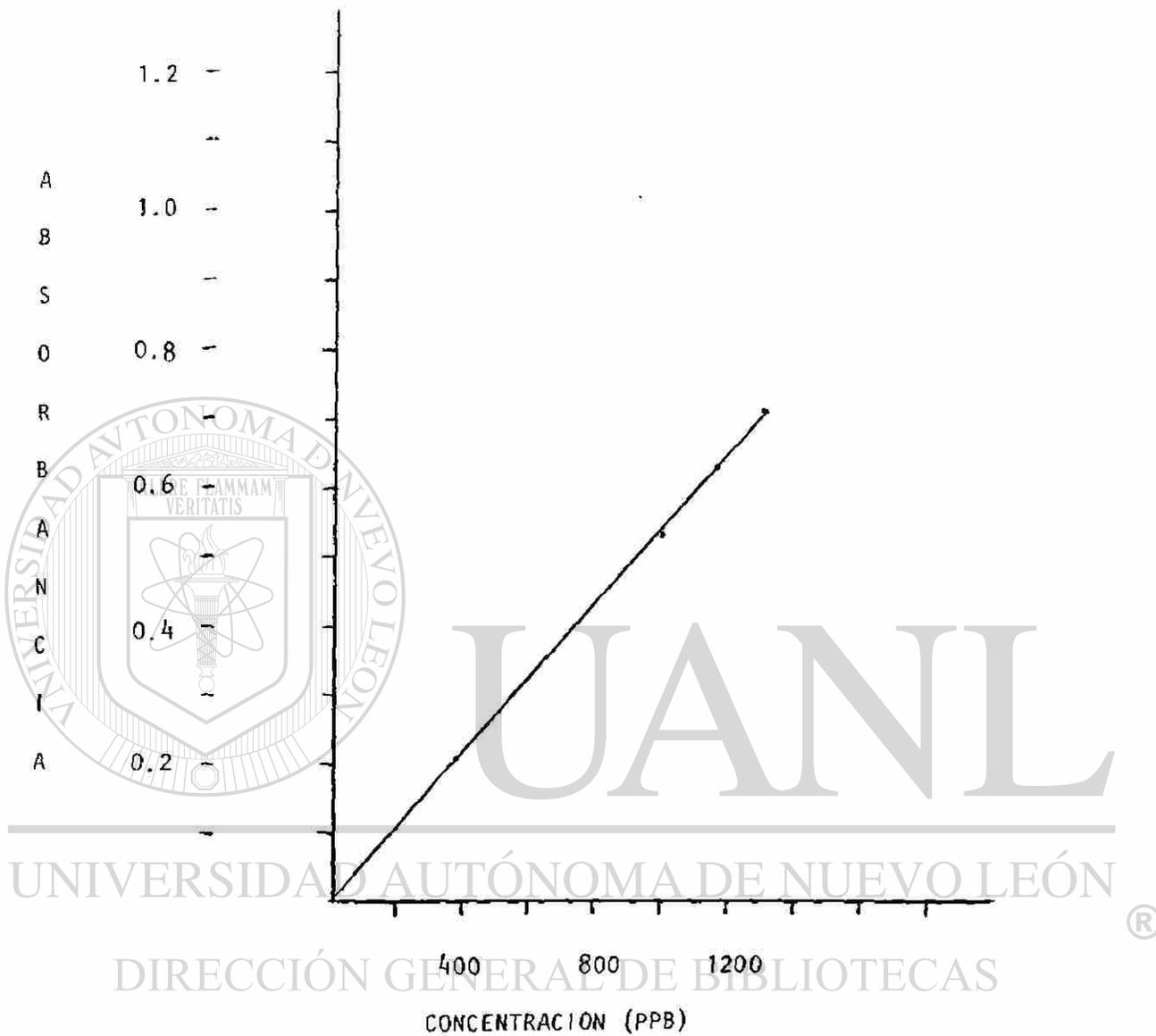
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B 1
 SIN DERIVATIZACION
 DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35
 LAMBDA: 365 nm.
 SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm.
 METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XI



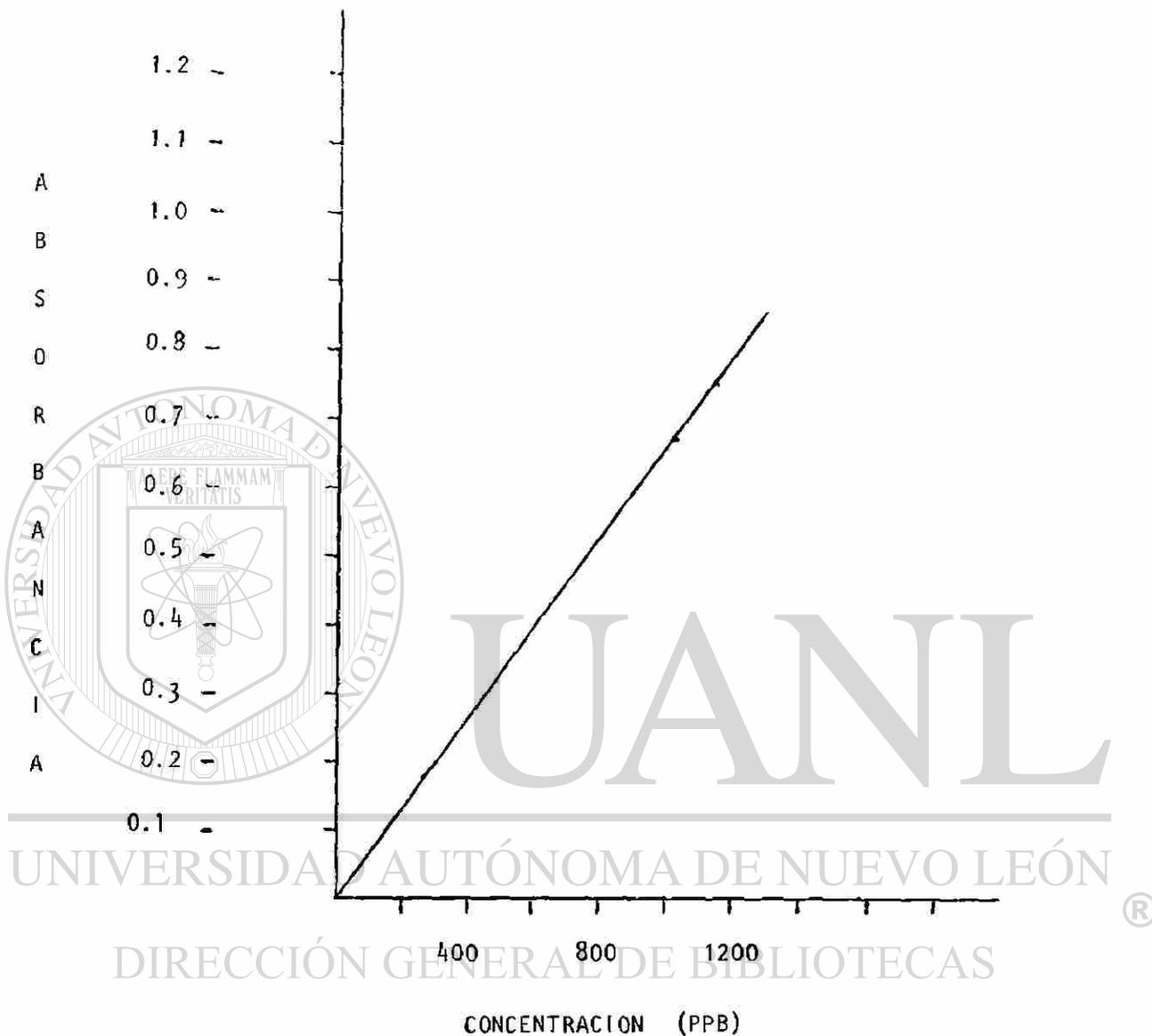
CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G 1
 SIN DERIVATIZACION.
 DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35.
 LAMBDA: 365 nm.
 SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm.
 METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XII



CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA G 2
 DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35.
 LAMBDA: 365 nm.
 SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm.
 METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XIII



CURVA DE CALIBRACION DE AFLATOXINA B 2
 DETECTOR: ULTRAVIOLETA BECKMAN MODELO 35
 LAMBDA: 365 nm
 SENSIBILIDAD: SLIT DE 0.1 mm
 METODO DE LECTURA: DIRECTO.

FIG. XIV

